



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 699 25 253 T2** 2006.02.09

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 062 364 B1**

(51) Int Cl.⁸: **C12Q 1/68** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **699 25 253.9**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR99/00547**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **99 909 002.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/046403**

(86) PCT-Anmeldetag: **11.03.1999**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.09.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **27.12.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **11.05.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **09.02.2006**

(30) Unionspriorität:
9802997 11.03.1998 FR

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT,
LI, LU, MC, NL, PT, SE**

(73) Patentinhaber:
Exonhit Therapeutics S.A., Paris, FR

(72) Erfinder:
**SCHWEIGHOFFER, Fabien, F-94300 Vincennes,
FR; BRACCO, Laurent, F-75013 Paris, FR;
TOCQUE, Bruno, F-92400 Courbevoie, FR**

(74) Vertreter:
**Dehmel & Bettenhausen, Patentanwälte, 80331
München**

(54) Bezeichnung: **QUALITATIVES DIFFERENTIELLES SCREENING**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Diese Erfindung bezieht sich auf die Technikgebiete Biotechnologie, Medizin, Biologie und Biochemie. Ihre Anwendungen betreffen die Gesundheit von Menschen, Tieren und Pflanzen. Ganz besonders erlaubt die Erfindung die Identifizierung der Nucleinsäure-Sequenzen, die die Entwicklung von neuen Screeningverfahren für Moleküle von therapeutischem Interesse, von neuen Werkzeugen der Gentherapie wie auch Hinweise auf das toxische Potenzial und das Verfolgen der Wirksamkeit von Molekülen und pharmakogenomischen Informationen zu liefern erlauben.

[0002] Die vorliegende Erfindung beschreibt eine Reihe neuartiger Techniken zur Identifizierung von Nucleinsäure-Sequenzen, die auf dem Aufzeigen von qualitativen Unterschieden zwischen den RNAs, die aus zwei verschiedenen Zusammenhängen stammen, die man zu vergleichen wünscht und die insbesondere von einem kranken Gewebe oder Organ und ihrem gesunden Äquivalent stammen. Genauer, diese Techniken sind für ein spezifisches Klonieren der alternativen Introns und Exons bestimmt, die in einer pathologischen Situation und einem gesunden Zustand oder in zwei physiologischen Situationen differentiell gespleißt sind, die man zu vergleichen wünscht. Diese qualitativen Unterschiede innerhalb der RNAs können ebenfalls aus Störungen des Genoms hervorgehen, wie Insertionen oder Deletionen in den Regionen, die in RNA transkribiert werden. Diese Reihe an Techniken wird mit dem Akronym DATAS bezeichnet: Differential Analysis of Transcripts with Alternative Splicing.

[0003] Die Charakterisierung der genetischen Expressionsstörungen, die eine bestimmte Krankheit beherrschen oder mit dieser verbunden sind, begründen eine bedeutende Hoffnung, neue therapeutische Ziele und neue Diagnosemittel zu entdecken. Jedoch liefert die Identifizierung einer genomischen oder komplementären DNA-Sequenz, die mittels positioneller Klonierung oder mittels quantitativer differentieller Screening-Techniken erfolgt war, nur wenig oder keine Information über die Funktion und noch weniger über die funktionellen Domänen, die bei den mit der untersuchten Krankheit verbundenen Deregulationen beteiligt sind. Die vorliegende Erfindung beschreibt eine Reihe neuartiger Techniken, die darauf abzielen, die Spleißunterschiede der RNAs zu identifizieren, die zwischen zwei verschiedenen physiopathologischen Situationen vorliegen. Die Identifizierung dieser Unterschiede liefert Informationen über die qualitativen Unterschiede und nicht über die quantitativen Unterschiede, wie es bei den bis heute beschriebenen Techniken der Fall ist. Die Gesamtheit der in der vorliegenden Erfindung angeführten Techniken werden folglich unter der Bezeichnung „qualitatives differentielleres Screening“ oder DATAS zusammengefasst. Zum Beispiel sind die Verfahren der Erfindung für die Identifizierung von neuen therapeutischen Zielen oder Produkten, für die Herstellung von Werkzeugen für die genetische Recherche und/oder von Diagnosemitteln, für den Aufbau von Nucleinsäure-Banken und in den Verfahren zur Bestimmung des toxikologischen Profils oder der Wirkung einer Verbindung zweckdienlich.

[0004] Ein erster Gegenstand der Erfindung beruht ganz besonders auf einem Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäure-Regionen, die für qualitative genetische Unterschiede zwischen zwei biologischen Proben repräsentativ sind, umfassend einen Schritt der Hybridisierung zwischen einer Population RNA oder doppelsträngiger cDNA, die aus einer ersten biologischen Probe stammt, und einer Population cDNA, die aus einer zweiten biologischen Probe stammt ([Fig. 1A](#)).

[0005] Wie oben angegeben, können diese qualitativen genetischen Unterschiede in Spleißmodifikationen der RNA oder Deletionen und/oder Insertionen in den Regionen des Genoms, die in RNA transkribiert werden, begründet sein.

[0006] In einer ersten Anwendungsform handelt es sich um eine Hybridisierung einer RNA-Population, die von einer ersten biologischen Probe stammt, und einer cDNA-Population (einzelssträngig oder doppelsträngig), die von einer zweiten biologischen Probe stammt.

[0007] In einer anderen Anwendungsform handelt es sich um eine Hybridisierung einer doppelsträngigen cDNA-Population, die von einer ersten biologischen Probe stammt, und einer cDNA-Population (doppelsträngig oder bevorzugt einzelssträngig), die von einer zweiten biologischen Probe stammt.

[0008] Ein ganz besonderer Gegenstand der Erfindung beruht auf einem Verfahren zur Identifizierung von Nucleinsäure-Regionen, die in zwei physiologischen Situationen unterschiedlich gespleißt sind, umfassend die Hybridisierung einer RNA-Population oder doppelsträngigen cDNA-Population, die von einer Testsituation stammt, mit einer cDNA-Population, die von einer Referenzsituation stammt, und die Identifizierung von Nucleinsäuren, die diesen differentiellen Spleißungen entsprechen.

[0009] Ein anderer Gegenstand der Erfindung betrifft ein Verfahren zur Klonierung von Nucleinsäuren, die zwischen zwei physiologischen Situationen differentiell gespleißt sind, umfassend die Hybridisierung einer RNA-Population oder doppelsträngigen cDNA-Population, die von einer Testsituation stammt, mit einer cDNA-Population, die von einer Referenzsituation stammt, und die Klonierung von Nucleinsäuren, die diesen differentiellen Spleißungen entsprechen.

[0010] In einer besonderen Anwendungsform umfasst das Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäuren der Erfindung zwei parallele Hybridisierungen:

- (a) die Hybridisierung der RNA, die von einer ersten Probe (Testsituation) stammt, mit der cDNA, die von einer zweiten Probe (Referenzsituation) stammt;
- (b) die Hybridisierung der RNA, die von einer zweiten Probe (Referenzsituation) stammt, mit der cDNA, die von einer ersten Probe (Testsituation) stammt;
- (c) die Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäuren, die qualitativen genetischen Unterschieden entsprechen, aus den in (a) und (b) gebildeten Hybriden.

[0011] Die vorliegende Erfindung betrifft ebenfalls die Herstellung von Nucleinsäure-Banken, die so erhaltenen Nucleinsäuren und Banken wie auch die Verwendungen dieser Materialien in allen Bereichen der Biologie/Biotechnologie, wie es später erläutert wird.

[0012] In dieser Hinsicht bezieht sich die Erfindung ebenfalls auf ein Verfahren zur Herstellung von Zusammensetzungen oder Banken von profilierten Nucleinsäuren, die für zwischen zwei biologischen Proben vorliegende qualitative Unterschiede repräsentativ sind, umfassend einen Schritt der Hybridisierung einer RNA-Population, die von einer ersten biologischen Probe stammt, mit einer cDNA-Population, die von einer zweiten biologischen Probe stammt.

[0013] Die Erfindung betrifft außerdem ein Verfahren zur Profilierung („Profiling“) einer cDNA-Zusammensetzung, umfassend einen Schritt der Hybridisierung dieser Zusammensetzung mit einer RNA-Population oder umgekehrt.

[0014] Wie oben angegeben, betrifft die vorliegende Erfindung insbesondere Verfahren zur Identifizierung und Klonierung von Nucleinsäuren, die für einen physiologischen Zustand repräsentativ sind. Außerdem repräsentieren die identifizierten Nucleinsäuren und/oder Klone die Merkmale eines physiologischen Zustands in dem Sinne, dass diese Nucleinsäuren im Allgemein zum großen Teil an dem beobachteten physiologischen Zustand beteiligt sind. Aus diesem Grund geben die qualitativen Verfahren einen direkten Zugang zu genetischen Elementen oder zu ihrem Proteinprodukt, das eine funktionelle Rolle bei der Entwicklung eines physiopathologischen Zustands spielt.

[0015] Die Verfahren gemäß der Erfindung beruhen zum Teil auf einem neuartigen Schritt der Kreuzhybridisierung zwischen RNA und cDNA von unterschiedlichen physiologischen Situationen. Diese Kreuzhybridisierung(en) erlauben vorteilhaft das Aufzeigen von ungepaarten Regionen in den gebildeten Hybriden, nämlich Regionen, die in den RNAs in einer bestimmten physiologischen Situation und nicht in den RNAs in einer anderen physiologischen Situation vorhanden sind. Diese Regionen entsprechen im Wesentlichen alternativen Spleißungen, die für einen physiologischen Zustand charakteristisch sind, können aber ebenfalls genetische Störungen wie Insertionen oder Deletionen widerspiegeln, und folglich besonders zweckdienliche genetische Elemente für die Therapie oder Diagnose bilden, wie es später erklärt wird. Die Erfindung besteht folglich insbesondere darin, die nach Kreuzhybridisierung(en) gebildeten Komplexe zu erhalten, um daraus die Regionen zu gewinnen, die qualitativen Unterschieden entsprechen. Diese Methodologie unterscheidet sich von quantitativen Subtraktionstechniken, die dem Fachmann bekannt sind (Sargent and Dawid (1983), Science, 222, 135-139; Davis et al. (1984), PNAS, 81, 2194-2198; Duguid and Dinanuer (1990) Nuc. Acid Res., 18, 2789-2792; Diatchenko et al. (1996) PNAS, 93, 6025-6030) [WO98/42781; Hubank et al., Nucleic Acid Res. 22 (1994) Vol. 22, Nr. 25, Seiten 5640-5648], die nach Hybridisierung(en) die gebildeten Hybride eliminieren, um nur die nicht komplexierten Nucleinsäuren zu erhalten. Ebenso führt Perret et al. (Gene 208 (1998) S. 103-115), im Gegensatz zur Erfindung, eindeutig eine Untersuchung von Expressionslevels von Genen in einer biologischen Probe auf, und berichtet keinesfalls von der Analyse ungepaarter Regionen in den gebildeten Hybriden zwischen zwei Proben. EP-A-0791 660 führt die Detektion einer einzigartigen Spleißstelle auf und berichtet weder von einem Verfahren zur Identifizierung von qualitativen Regionen noch von Verfahren und Werkzeugen der Analyse gemäß der Erfindung.

[0016] Die Erfindung betrifft folglich an erster Stelle ein Verfahren zur Identifizierung von Nucleinsäuren von Interesse, umfassend die Hybridisierung zwischen der RNA einer Testprobe und der cDNA einer Referenzpro-

be. Diese Hybridisierung erlaubt das Aufzeigen innerhalb der gebildeten Komplexe von qualitativen genetischen Unterschieden zwischen den getesteten Situationen und daher die Identifizierung und/oder Klonierung von zum Beispiel für die Testsituation charakteristischen Spleißungen.

[0017] Gemäß einer ersten Variante der Erfindung erlaubt das Verfahren folglich die Generierung einer Population von Nucleinsäuren, die für Spleißungen des physiologischen Testzustands im Vergleich zum Referenzzustand charakteristisch sind ([Fig. 1A](#), [Fig. 1B](#)). Wie später angegeben, kann diese Population für die Klonierung und die Charakterisierung der Nucleinsäuren, für ihre Verwendung in Diagnose, Screening, Therapie oder für die Herstellung von Antikörpern oder Proteinfragmenten oder von ganzen Proteinen verwendet werden. Diese Population kann ebenfalls für die Bildung von Banken, die in verschiedenen, später angeführten Anwendungsbereichen verwendbar sind, und für die Herstellung von markierten Sonden ([Fig. 1D](#)) dienen.

[0018] Gemäß einer anderen Variante der Erfindung umfasst das Verfahren eine erste Hybridisierung, wie sie oben beschrieben ist, und eine parallele zweite Hybridisierung zwischen der RNA, die von der Referenzsituation stammt, und der cDNA, die von einer Testsituation stammt. Diese Variante ist besonders vorteilhaft, da sie die Generierung zweier Nucleinsäure-Populationen erlaubt, wobei eine die Merkmale der Testsituation im Vergleich zur Referenzsituation und die andere die Merkmale der Referenzsituation im Vergleich zur Testsituation repräsentiert ([Fig. 1C](#)). Diese beiden Populationen können ebenfalls als Quelle von Nucleinsäuren verwendet sein, wie auch als Marker-Bank des genetischen Abdrucks von einer bestimmten physiologischen Situation, wie es später genauer angegeben wird ([Fig. 1D](#)).

[0019] Die vorliegende Erfindung kann auf alle Arten biologischer Proben angewandt werden. Insbesondere kann die biologische Probe jede Zelle, jedes Organ, Gewebe, jede Entnahme, Biopsie etc. sein, das/die Nucleinsäuren enthält. Handelt es sich um ein Organ, Gewebe oder Biopsie, werden sie gegebenenfalls kultiviert, um einen Zugang zu den Zellen zu erlauben, aus denen sie bestehen. Es kann sich um Proben handeln, die von Säugern (insbesondere Menschen), von Pflanzen, Bakterien oder niederen eukaryotischen Zellen (Hefen, Pilzzellen) stammen. Beispiele für Materialien sind insbesondere eine Tumorbiose, eine Biopsie neurodegenerativer Plaques oder von Gehirnbereichen, die neurodegenerative Schäden aufweisen, eine Hautprobe, eine Probe von Blutzellen, die nach einer Blutentnahme erhalten sind, eine colorektale Biopsie, Biopsien, die von Lungenspülungen stammen, etc. Beispiele für Zellen sind insbesondere Muskelzellen, Leberzellen, Fibroblasten, Nervenzellen, Epidermiszellen, Hautzellen, Blutzellen wie die T-, B-Lymphocyten, Monocyten, Mastocyten, Granulocyten, Makrophagen.

[0020] Wie oben angegeben, erlaubt das qualitative differentielle Screening gemäß der Erfindung die Identifizierung von Nucleinsäuren, die für eine bestimmte physiologische Situation (Situation B) charakteristisch sind, durch Vergleich mit einer physiologischen Referenzsituation (Situation A) im Hinblick auf ihre Klonierung oder andere Verwendungen. Als Veranschaulichung können die untersuchten physiologischen Situationen A und B die Folgenden sein:

Situation A	Situation B
gesunde Probe	pathologische Probe
gesunde Probe	apoptotische Probe
gesunde Probe	Probe nach Virusinfektion
auf X empfindliche Probe	für X resistente Probe
nichtbehandelte Probe	behandelte Probe (zum Beispiel mit einer toxischen Verbindung)
nicht differenzierte Probe	Probe, die einer Zell- oder Gewebedifferenzierung unterzogen wurde

RNA-Populationen

[0021] Für die Anwendung der vorliegenden Erfindung ist es möglich, Gesamt-RNA oder die Messenger-RNA zu verwenden. Diese RNAs können mit allen herkömmlichen molekularbiologischen Verfahren präpariert sein, die dem Fachmann gut bekannt sind. Diese Verfahren umfassen im Allgemeinen eine Lyse der Zellen oder des

Gewebes oder der Proben und die Isolierung der RNAs mittels Extraktionsverfahren.

[0022] Es kann sich insbesondere um eine Behandlung mit chaotropen Mitteln wie beispielsweise Guanidin-thiocyanat (das die Zellen zerstört und die RNA schützt) und anschließende RNA-Extraktion mit Lösemitteln (zum Beispiel Phenol, Chloroform) handeln. Derartige Verfahren sind dem Fachmann wohl bekannt (siehe Maniatis et al., Chomczynski et al., Anal. Biochem. 162 (1987) 156). Diese Verfahren können ohne weiteres unter Verwendung von im Handel erhältlichen Kits angewandt sein wie zum Beispiel das Kit US73750 (Amersham) oder das Kit Rneasy (Qiagen) für die Gesamt-RNA. Es ist nicht erforderlich, dass die eingesetzten RNAs ganz rein sind und insbesondere stört es nicht, wenn Spuren genomischer DNA oder anderer Zellbestandteile (Proteine, etc.) in den Präparaten verbleiben, da sie die Stabilität der RNAs nicht signifikant beeinflussen und wenn die Art und Weise der Präparation zwischen den beiden zu vergleichenden verschiedenen Proben die gleichen sind. Außerdem ist es wahlweise möglich, nicht Gesamt-RNA Präparate sondern Messenger-RNA Präparate zu verwenden. Diese können entweder direkt aus einer biologischen Probe oder aus Gesamt-RNA mit Hilfe von polyT-Sequenzen gemäß herkömmlichen Verfahren isoliert sein. Die Gewinnung von Messenger-RNA kann in dieser Hinsicht mit Hilfe kommerzieller Kits durchgeführt sein, wie beispielsweise mit Kit US72700 (Amersham) oder einem oligo-(dT) Kügelchen verwendenden Kit (Dyna). Ein vorteilhafte Art der RNA-Präparation besteht darin, die cytosolischen RNAs, dann die cytosolischen polyA⁺ RNAs zu extrahieren. Kits, die die selektive Präparation von cytosolischen RNAs erlauben, die nicht mit Prämessenger-RNAs kontaminiert sind, die Träger von nicht gespleißten Exons und Introns sind, sind im Handel erhältlich. Dies sind insbesondere die von Qiagen erhältlichen Rneasy Kits (Bezugsbeispiel: 74103). Die RNAs können ebenfalls direkt aus Banken oder anderen Proben gewonnen sein, die bereits hergestellt und/oder in Sammlungen zugänglich und unter geeigneten Bedingungen aufbewahrt sind.

[0023] Im Allgemeinen umfassen die verwendeten RNA-Präparate vorteilhaft wenigstens 0,1 µg RNA, vorzugsweise wenigstens 0,5 µg RNA. Die Mengen können entsprechend den verwendeten Zellen und Verfahren variieren, ohne die Durchführung der vorliegenden Erfindung zu verändern. Um hinreichende Mengen an RNA zu gewinnen (vorzugsweise wenigstens 0,1 µg), ist es im Allgemeinen empfohlen, eine biologische Probe zu verwenden, die wenigstens 10⁵ Zellen umfasst. In dieser Hinsicht umfasst eine klassische Biopsie allgemein zwischen 10⁵ und 10⁸ Zellen, und eine Zellkultur in einer klassischen Petri-Schale (Durchmesser 6-10 cm) umfasst größenordnungsmäßig 10⁶ Zellen, was die leichte Gewinnung hinreichender RNA-Mengen erlaubt.

[0024] Die RNA-Präparate können unmittelbar verwendet werden oder für spätere Verwendungen aufbewahrt werden, vorzugsweise in Kälte, in Lösung oder gefroren.

cDNA-Populationen

[0025] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten cDNAs können durch inverse Transkription entsprechend herkömmlichen molekularbiologischen Techniken erhalten sein. Man kann insbesondere sich auf Maniatis et al. beziehen. Die inverse Transkription wird im Allgemeinen unter Verwendung eines Enzyms, inverse Transkriptase („reverse Transkriptase“), und eines Primers durchgeführt.

[0026] In dieser Hinsicht sind zahlreiche inverse Transkriptasen in der Literatur beschrieben worden und sind kommerziell erhältlich (Kit 1483188, Boehringer). Als Beispiele kann man die am häufigsten verwendeten inversen Transkriptasen nennen wie die des avianen Virus AMV (Avian Myeloblastosis Virus) und des murinen Leukämie-Virus MMLV (Moloney Murine Leukemia Virus). Man kann ebenfalls bestimmte thermostabile DNA-Polymerasen nennen, die eine inverse Transkriptase-Aktivität besitzen, wie diejenigen, die aus *Thermus flavus* und *Thermus thermophilus* HB-8 isoliert sind (kommerziell erhältlich, Bezugsquelle Promega M1941 und M2101). Gemäß einer vorteilhaften Variante kann man zur Durchführung der vorliegenden Erfindung die inverse Transkriptase von AMV verwenden, da dieses Enzym, das bei 42°C arbeitet (im Gegensatz zum MMLV-Enzym, das bei 37°C arbeitet) bestimmte Sekundärstrukturen der RNA destabilisiert, die die Elongation blockieren könnten, und folglich die inverse Transkription der RNA von einer bedeutenden Länge erlaubt, und erlaubt, cDNA-Präparate zu erhalten, die die RNA mit einer großen Genauigkeit und einer großen Effizienz darstellt.

[0027] Gemäß einer anderen vorteilhaften Variante der Erfindung verwendet man eine inverse Transkriptase ohne RNase H-Aktivität. Die Verwendung dieses Enzymtyps bietet mehrere Vorteile und insbesondere den Vorteil der Erhöhung der Leistung der Synthese der cDNA und die Verhinderung jeglichen Abbaus der RNA, die anschließend in den Heteroduplexen mit den neusynthetisierten cDNA beteiligt sind, was folglich eventuell ein Verzicht auf die Phenolextraktion von diesen erlaubt. Die inversen Transkriptasen ohne RNase H-Aktivität können aus jeder inversen Transkriptase mittels Deletion(en) und/oder Mutagenese hergestellt sein. Außerdem sind derartige Enzyme ebenfalls im Handel erhältlich (zum Beispiel Life Technologies, Referenz

18053-017).

[0028] Die Anwendungsbedingungen der inversen Transkriptasen (Konzentration und Temperatur) sind dem Fachmann gut bekannt. Insbesondere verwendet man im Allgemeinen 10 bis 30 Enzymeinheiten pro Reaktion in Gegenwart einer optimalen Mg^{2+} -Konzentration von 10 mM.

[0029] Der oder die für die inverse Transkription eingesetzten Primer können unterschiedlicher Natur sein. Es kann sich insbesondere um zufällige („random“) Oligonucleotide handeln, die vorzugsweise zwischen 4 und 10 Nucleotide, vorteilhaft ein Hexanucleotid, umfassen. Die Verwendung dieser Art Zufallsprimer ist in der Literatur beschrieben worden und erlaubt die Initiation der inversen Transkription an verschiedenen zufälligen Positionen innerhalb der RNA-Moleküle. Diese Technik ist besonders für die inverse Transkription der Gesamt-RNA (nämlich die mRNA, die tRNA und die rRNA umfassend) eingesetzt. In dem Fall wo man nur die inverse Transkription der mRNA durchführen möchte, ist es von Vorteil als Primer ein oligo-dT Oligonucleotid zu verwenden, das die Initiation der inversen Transkription von den polyA-Schwänzen aus erlaubt, die für Messenger-RNA spezifisch sind. Das oligo-dT Oligonucleotid kann 4 bis 20-mere, vorteilhaft ungefähr 15-mere, umfassen. Der Einsatz dieses Primer-Typs bildet eine bevorzugte Anwendungsform der vorliegenden Erfindung. Andererseits kann es vorteilhaft sein, für die inverse Transkription einen markierten Primer zu verwenden. Dies kann daher erlauben, die RNA nachträglich von der cDNA zu identifizieren und/oder zu selektieren und/oder zu sortieren. Dies kann ebenfalls die Isolierung der RNA/DNA-Heteroduplexe erlauben, deren Bildung einen Schlüsselschritt der Erfindung darstellt. Die Markierung des Primers kann in einem beliebigen System des Ligand-Empfänger-Typs bestehen, nämlich das die Trennung der den Primer tragenden Moleküle mittels Affinität erlaubt. Es kann sich zum Beispiel um eine Markierung mit Biotin handeln, die mit jedem Träger (Kügelchen, Säule, Platte etc.) getrennt werden kann, auf dem das Streptavidin fixiert ist. Jedes andere Markierungssystem, das diese Trennung erlaubt, ohne die Eigenschaften des Primers zu beeinflussen, kann in äquivalenter Weise verwendet sein.

[0030] Unter den üblichen Durchführungsbedingungen generiert diese inverse Transkription einzelsträngige komplementäre (cDNA) DNAs. Dies bildet eine erste vorteilhafte Form der vorliegenden Erfindung.

[0031] In einer zweiten Durchführungsvariante wird die inverse Transkription so durchgeführt, dass doppelsträngige cDNA hergestellt wird. Um dies zu erreichen, kann der zweite Strang, nach Transkription des ersten cDNA-Strangs, entsprechend herkömmlichen molekularbiologischen Techniken generiert werden, unter Verwendung von Enzymen für die Modifikation der DNA, wie DNA-Ligase, DNA-Polymerase I und DNA-Polymerase des Phagen T4.

[0032] Die cDNA-Präparate können unmittelbar verwendet werden oder für spätere Verwendungen aufbewahrt werden, vorzugsweise in der Kälte, in Lösung oder gefroren.

Hybridisierungen

[0033] Wie oben erklärt, beruhen die Verfahren gemäß der Erfindung zum Teil auf einem neuartigen Schritt der Kreuzhybridisierung zwischen RNA und cDNA, die aus biologischen Proben in unterschiedlichen physiologischen Situationen oder unterschiedlichen Ursprungs stammen. In einer bevorzugten Anwendungsform erfolgt die Hybridisierung bevorzugt in flüssiger Phase. Außerdem kann die Hybridisierung in jeder geeigneten Vorrichtung durchgeführt sein, wie beispielsweise Röhrchen (zum Beispiel Eppendorf), Platten oder jeden anderen geeigneten Träger, der üblicherweise in der Molekularbiologie Verwendung findet. Die Hybridisierung erfolgt vorteilhafterweise in Volumina zwischen 10 und 1000 μ l zum Beispiel zwischen 10 und 500 μ l. Es ist zu verstehen, dass die verwendete Vorrichtung und die verwendeten Volumina ohne weiteres vom Fachmann angepasst sein können. Die für die Hybridisierung eingesetzten Mengen von Nucleinsäuren sind ebenfalls dem Fachmann bekannt. Im Allgemeinen sind Mikrogramm-Mengen für Nucleinsäuren hinreichend, zum Beispiel in einer Größenordnung von 0,1 bis 100 μ g. Ein sehr wichtiges Element bei der Durchführung der Hybridisierungen beruht auf den jeweiligen Mengen von eingesetzten Nucleinsäuren. Daher ist es möglich, die Nucleinsäuren in einem cDNA/RNA-Verhältnis, variierend von 50 bis ungefähr 0,02, vorzugsweise von 40 bis 0,1, einzusetzen. Ganz besonders von Vorteil ist es, ein cDNA/RNA-Verhältnis von nahe oder größer 1 zu bevorzugen. Denn in diesen Experimenten bildet die RNA die Testverbindung („Tester“) und die cDNA bildet den Träger („Driver“). Aus diesem Grund ist es wegen der Verbesserung der Spezifität des Verfahrens zu bevorzugen, dass es unter Bedingungen durchgeführt ist, wo der „Driver“ im Verhältnis zum „Tester“ im Überschuss vorliegt. Denn unter diesen Bedingungen funktioniert das Zusammenspiel zwischen den Nucleinsäuren und die nicht perfekten Paarungen sind stark benachteiligt. Aus diesem Grund sind die einzigen auftretenden Fehlpaarungen im Allgemeinen in dem Vorhandensein von Regionen in den „Tester“ RNA begründet, die nicht in der „Dri-

ver" cDNA vorkommen und die folglich spezifisch sind. Um die Spezifität des Verfahrens zu fördern, ist die Hybridisierung vorteilhaft bei einem cDNA/RNA-Verhältnis von einschließlich ungefähr 1 bis ungefähr 10 durchgeführt. Es ist sehr wohl zu verstehen, dass das Verhältnis vom Fachmann entsprechend den Verfahrensbedingungen (zur Verfügung stehende Mengen an Nucleinsäuren, physiologische Situationen, verfolgte Absicht, etc.) angepasst sein kann. Die anderen Parameter der Hybridisierung (Zeit, Temperatur, Ionenstärke) können ebenfalls vom Fachmann angepasst sein. Im großen und ganzen erfolgt die Hybridisierung nach Denaturierung von „Tester“ und „Driver“ (zum Beispiel durch Erwärmen) innerhalb von etwa 2 bis 24 Stunden bei einer Temperatur von etwa 37°C (eventuell Temperaturerhöhungen unterworfen, wie später noch beschrieben) und unter Standardbedingungen der Ionenstärke (kann beispielsweise zwischen 0,1 bis 5 M NaCl variieren). Es ist bekannt, dass die Ionenstärke einer der entscheidenden Faktoren für die Stringenz einer Hybridisierung ist, besonders im Falle einer Hybridisierung auf einem festen Träger.

[0034] Gemäß einer besonderen Anwendungsform der Erfindung ist die Hybridisierung in einer Phenol-Emulsion durchgeführt, zum Beispiel gemäß der PERT-Technik („Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique“), die von Kohne D.E. et al. (Biochemistry, Vol. 16, Nr. 24, Seiten 5329-5341, 1977) beschrieben ist. Vorteilhafterweise verwendet man im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Hybridisierung in Phenol-Emulsion, die mit Hilfe von Thermocyclen (Temperaturerhöhungen von etwa 37°C auf etwa 60/65°C) und nicht durch Rühren gemäß der von Miller und Riblet beschriebenen Technik (NAR 23 (1995) 2339) durchgeführt ist. Jede andere Hybridisierungstechnik in Flüssigphase, vorzugsweise in Emulsion, kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung eingesetzt sein. Daher ist die Hybridisierung in einer anderen Form besonders vorteilhaft in einer Lösung, die 80% Formamid enthält, bei einer Temperatur von zum Beispiel 40°C durchgeführt.

[0035] Die Hybridisierung kann ebenfalls mit einem auf einem Träger immobilisierten Partner erfolgen. Vorteilhafterweise ist die cDNA immobilisiert. Dies kann durchgeführt sein, indem die Markierung genutzt wird, deren Ziel die cDNAs sein können besonders aufgrund der biotinylierten Primer. Die Biotin-Gruppen werden mit den magnetischen Kügelchen in Kontakt gebracht, auf denen Streptavidin-Moleküle verankert sind. Die cDNAs können dann mit Hilfe eines Magneten an einem Filter oder an einer Vertiefung einer Mikrotiterplatte erhalten werden. Die RNAs werden dann unter den erforderlichen Bedingungen hoher Ionenstärke mit den cDNAs in Kontakt gebracht. Die ungepaarten RNAs werden durch Waschen entfernt. Die hybridisierten RNAs wie auch die cDNAs werden durch Abschalten des Magnetfeldes wiedergewonnen.

[0036] In dem Fall wo die cDNA doppelsträngig ist, ähneln die angewandten Hybridisierungsbedingungen im Wesentlichen den oben beschriebenen und können vom Fachmann angepasst werden. Man bevorzugt in diesem Fall die Durchführung der Hybridisierung in Gegenwart von Formamid und setzt die Komplexe Temperaturen aus, die zum Beispiel von 60 bis 40°C, bevorzugt von 56°C bis 44°C reichen, um die Bildung von Komplexen des Typs R-Schleife zu fördern. Zudem ist es erwünscht, nach der Hybridisierung ein Mittel zur Stabilisierung der gebildeten Triplices zuzugeben, wenn das Formamid aus dem Medium entfernt ist, wie zum Beispiel Glyoxal (Kaback et al. (1979) Nucl. Acid Res., 6, 2499-2517).

[0037] Diese Kreuzhybridisierungen gemäß der Erfindung generieren daher Zusammensetzungen, die cDNA/RNA-Heteroduplexe oder Heterotriplices umfassen, die die Merkmale jeder getesteten physiologischen Situation repräsentieren. Wie oben angegeben, können in jeder dieser Zusammensetzungen Nucleinsäuren identifiziert und/oder kloniert werden, die im Wesentlichen differentiellen alternativen Spleißungen oder anderen genetischen Störungen entsprechen, die für jede physiologische Situation spezifisch sind.

[0038] Die Erfindung betrifft folglich vorteilhaft ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäure-Regionen, die für qualitative genetische Unterschiede zwischen zwei physiologischen Situationen repräsentativ sind, umfassend einen Schritt der Hybridisierung von RNA, die aus einer biologischen Probe in einer ersten physiologischen Situation stammt, und einzelsträngiger cDNA, die aus einer biologischen Probe in einer zweiten physiologischen Situation stammt, und die Identifizierung und/oder Klonierung von ungepaarten RNA-Regionen aus den gebildeten Klonen.

[0039] Diese erste Variante beruht ganz besonders auf der Heteroduplex-Bildung zwischen RNA und einzelsträngiger cDNA (siehe [Fig. 2-Fig. 4](#)). Diese Variante ist vorteilhaft unter Verwendung von Messenger-RNA oder cDNA durchgeführt, die durch inverse Transkription von Messenger-RNA gebildet ist, nämlich in Gegenwart eines oligo dT-Primers.

[0040] In einer besonderen Anwendungsform umfasst das Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäuren der Erfindung:

(a) die Hybridisierung von RNA, die von einer Testsituation stammt, mit der einzelsträngigen cDNA, die von

einer Referenzsituation stammt;

(b) die Hybridisierung der RNA, die von einer Referenzsituation stammt, mit der einzelsträngigen cDNA, die von einer Testsituation stammt;

(c) die Identifizierung und/oder Klonierung von ungepaarten RNA-Regionen aus den in (a) und (b) gebildeten Hybriden;

[0041] In einer besonderen Variante der Anwendung umfasst das Verfahren der Erfindung die folgenden Schritte:

(a) die Gewinnung von RNA aus einer biologischen Probe in einer physiologischen Situation A (rA);

(b) die Gewinnung von RNA aus derselben biologischen Probe in einer physiologischen Situation B (rB);

(c) die Präparation von cDNA aus einem Teil der in (a) gewonnenen rA RNA (cA DNA) und aus einem Teil der in (b) gewonnenen rB RNA (cB DNA) mit Hilfe von polyT-Primern,

(d) die Hybridisierung in flüssiger Phase eines Teils der rA RNA mit einem Teil der cB DNA (um rA/cB-Heteroduplices zu generieren),

(e) die Hybridisierung in flüssiger Phase eines Teils der rB RNA mit einem Teil der cA DNA (um rB/cA-Heteroduplices zu generieren),

(f) die Identifizierung und/oder Klonierung von RNA-Regionen, die in den in (d) und (e) erhaltenen rA/cB und rB/cA Heteroduplices ungepaart sind.

[0042] In einer anderen besonderen Variante der Anwendungsform umfasst das Verfahren der Erfindung die Hybridisierung von RNA, die von der Testsituation stammt, mit doppelsträngiger cDNA, die von der Referenzsituation stammt, und die Identifizierung und/oder Klonierung von erhaltenen doppelsträngigen DNA-Regionen. Diese zweite Variante beruht ganz besonders auf der Heterotriplex-Bildung zwischen der RNA und der doppelsträngigen cDNA, die von Strukturen des Typs R-Schleife abgeleitet sind (siehe [Fig. 5](#)). Angewandt wird diese Variante ebenfalls bevorzugt unter Verwendung von Messenger-RNAs oder cDNAs, die hauptsächlich durch inverse Transkription von Messenger-RNAs hergestellt sind, nämlich in Gegenwart eines polyT Primers. Bei dieser Variante umfasst ebenfalls eine besondere Anwendungsform zwei parallele Hybridisierungen, die zwei Populationen von Nucleinsäuren gemäß der Erfindung generieren. In dieser Variante sind die gesuchten Regionen, die für alternative Spleißungen spezifisch sind, nicht die ungepaarten RNA-Regionen, sondern doppelsträngige DNA, die nicht von einer homologen RNA-Sequenz verdrängt werden konnten (siehe [Fig. 5](#)).

[0043] In einer anderen Variante der Erfindung umfasst das Verfahren für die Isolierung der qualitativen genetischen Unterschiede (z.B. die Spleißunterschiede), die zwischen zwei Proben vorhanden sind, die Hybridisierung zwischen einer Population von doppelsträngiger cDNA, die von einer ersten biologischen Probe stammt, und einer cDNA-Population (doppelsträngig, vorzugsweise einzelsträngig), die von einer zweiten biologischen Probe stammt (**Fig. 6**).

[0044] Im Unterschied zu den vorhergehend dargelegten Varianten verwendet diese Variante weder DNA/RNA-Heteroduplices noch Heterotriplices, sondern DNA/DNA-Homoduplices. Diese Variante ist von Vorteil, da sie nicht nur einen Zugang zu alternativen Exons und zu Introns erlaubt, sondern ebenfalls, und innerhalb derselben Nucleinsäure-Bank, zu spezifischen Verknüpfungen, die durch Deletion eines Exons oder Introns geschaffen sind. Zudem erlauben die Sequenzen in einer derartigen Bank den Zugang zu alternativen Exons und Introns flankierenden Sequenzen.

[0045] Für die Untersuchung der beiden Proben (d.h. physiopathologische Zustände) werden die cytosolischen polyA+ RNA entsprechend dem Fachmann bekannten und genau beschriebenen Techniken extrahiert. Diese werden dann in cDNA mit Hilfe einer inversen Transkriptase umgeschrieben, die keinerlei intrinsische RNase H Aktivität besitzt, wie bereits beschrieben. Eine dieser einzelsträngigen cDNA wird dann in doppelsträngige cDNA mit Hilfe von hexameren Zufallsprimern und gemäß dem Fachmann bekannten Techniken umgewandelt. Für eine dieser untersuchten Situationen verfügen wir folglich über eine einzelsträngige cDNA (als „Driver“ bezeichnet) und für die andere Situation über eine doppelsträngige cDNA (als „Tester“ bezeichnet). Diese cDNA werden durch Erhitzen denaturiert, dann so gemischt, dass der Driver im Überschuss bezogen auf den Tester vorliegt. Dieser Überschuss wird zwischen 1 und 50-fach, vorteilhaft 10-fach, gewählt. In einem bestimmten Versuch, der mit beiden physiopathologischen Situationen vorgenommen wird, ist die Situation, die den Driver bestimmt, zufällig gewählt und darf nicht die Natur der gewonnenen Informationen beeinflussen. Daher beruht, wie im Falle der zuvor angeführten Versuchsansätze, die Strategie zur Identifizierung der qualitativen Unterschiede, die es zwischen zwei mRNA-Populationen gibt, auf der Klonierung dieser Unterschiede, die in den gemeinsamen Messenger vorliegen: die Strategie beruht auf der Klonierung von Sequenzen, die im Innern des Duplex vorliegen, und nicht von einzelsträngigen Sequenzen, die den singulären oder den überschüssigen Sequenzen entsprechen, in einer der untersuchten Situationen. Die Mischung der cDNA-Popula-

tionen wird gefällt, dann in einer Formamid-haltigen Lösung (zum Beispiel 80%) wieder aufgenommen. Die Hybridisierung wird 16 bis 48 Stunden, vorteilhaft 24 Stunden, durchgeführt. Die Produkte dieser Hybridisierung werden gefällt, dann der Wirkung einer Endonuclease mit einer Erkennungsstelle der doppelsträngigen DNA ausgesetzt, die von 4 Basen bestimmt ist. Ein derartiges Restriktionsenzym wird folglich doppelsträngige cDNA, die bei der Hybridisierung gebildet wird, durchschnittlich aller 256 Basen schneiden. Dieses Enzym ist vorteilhaft ausgewählt, um klebrige Enden zu erzeugen. Beispiele für derartige Enzyme sind Restriktionsenzyme wie *Sau3AI*, *HpaII*, *TaqI* und *MseI*. Die doppelsträngigen Fragmente, die von diesen Enzymen geschnitten sind, sind folglich für eine Klonierungsstrategie zugänglich, die die geschnittenen Restriktionsstellen verwendet. Diese Fragmente bestehen aus zwei Typen: perfekt hybridisierte Fragmente, deren beide Stränge perfekt komplementär sind, und Fragmente, deren Hybridisierung partiell ist, nämlich eine einzelsträngige Schleife umfassend, die von doppelsträngigen Bereichen flankiert ist ([Fig. 6A](#)). Diese wenigen letzteren Fragmente enthalten die Informationen von Interesse. Um sie von der Mehrheit der perfekt hybridisierten Fragmente zu trennen, da sie sich mehrheitlich von der Länge der cDNA ableiten, werden Trenntechniken auf Gelen oder anderen geeigneten Matrices eingesetzt. Diese Techniken nutzen die verzögerte Migration bei der Elektrophorese oder besonders Gelfiltration von DNA-Fragmenten, die eine Schleife einzelsträngiger DNA umfassen. Daher können die Populationen der wenigen Fragmente, die die gewünschten Informationen enthalten, präparativ von der Population von mehrheitlichen Fragmenten getrennt werden, die identischen DNA-Regionen in beiden Populationen entsprechen. Diese Variante, die die Isolierung der positiven und negativen Merkmale innerhalb derselben Population erlaubt, die mit qualitativen Unterschieden verbunden sind, kann ebenfalls mit RNA/DNA-Heteroduplexen angewandt werden. In dieser Hinsicht ist ein Beispiel einer verzögerten Migration eines RNA/DNA-Heteroduplex, in dem ein Teil der RNA ungepaart ist, im Vergleich zu einem homologen Heteroduplex, in dem alle Sequenzen gepaart sind, mit dem *grb2/grb33* Modell veranschaulicht, das in den Beispielen beschrieben ist (siehe insbesondere [Fig. 8](#), Vertiefungen 2 und 3).

Identifizierung und Klonierung

[0046] Aus den durch Hybridisierung generierten Nucleinsäure-Populationen können die Regionen, die für qualitative Unterschiede (z.B. differentielle alternative Spleißungen) charakteristisch sind, mit jeder dem Fachmann bekannten Technik identifiziert werden.

Identifizierung und Klonierung aus RNA/DNA-Heteroduplexen

[0047] Im Falle von RNA/DNA-Heteroduplexen (erste Variante des Verfahrens) kommen diese Regionen daher hauptsächlich als ungepaarte RNA-Regionen (RNA-Schleifen) vor, wie in [Fig. 3](#) dargestellt. Diese Regionen können folglich durch Abtrennung der Heteroduplexen und der einzelsträngigen Nucleinsäuren (DNA, RNA) (nichtreagierte überschüssige Nucleinsäuren), selektiven Verdau der doppelsträngigen RNA (an den Heteroduplexen beteiligte Domänen), dann Abtrennung der resultierenden einzelsträngigen RNA und der einzelsträngigen DNA identifiziert und kloniert werden.

[0048] In dieser Hinsicht gemäß einem in [Fig. 3](#) veranschaulichten ersten Versuchsansatz werden die ungepaarten RNA-Regionen durch Behandlung der Heteroduplexen mit Hilfe eines Enzyms identifiziert, das in der Lage ist, selektiv die RNA-Domänen zu verdauen, die an den RNA/DNA-Heteroduplexen beteiligt sind. Enzyme mit dieser Eigenschaft sind in der Technik bereits beschrieben und sind im Handel erhältlich. Dies sind die RNasen H, wie insbesondere die von *E. coli* in rekombinanter Form produzierte RNase H, die im Handel erhältlich ist (Promega Ref. M4281; Life Technologies Ref. 18021). Diese erste Behandlung erzeugt folglich ein Gemisch, das die einzelsträngigen ungepaarten RNA-Regionen und die einzelsträngige cDNA umfasst. Die RNAs können von den cDNAs mit jeder dem Fachmann bekannten Technik und insbesondere auf Basis der Markierung für die Präparation der cDNA verwendeten Primer (siehe oben) getrennt werden. Diese RNAs können als Ausgangsmaterial für die Identifizierung von Zielen, von genetischen Produkten von Interesse oder für jede andere Anwendung verwendet werden. Diese RNAs können ebenfalls in cDNAs umgeschrieben, dann in Vektoren kloniert werden, wie es oben beschrieben ist.

[0049] In dieser Hinsicht kann die Klonierung der RNAs auf verschiedene Weisen durchgeführt sein. Eine besteht darin, an jedem Ende der RNA Oligonucleotide zu inserieren, die als Matrize für eine inverse Transkription in Gegenwart entsprechender Primer dienen. Dieses Hinzufügen von Primern geschieht gemäß dem Fachmann bekannten Techniken mit Hilfe eines Enzyms wie zum Beispiel die RNA-Ligase, die vom T4 Phagen stammt und die die Bildung von intermolekularen Phosphodiester-Bindungen zwischen dem 5'-Phosphat eines Donator-Moleküls und dem 3'-Hydroxyl eines Akzeptor-Moleküls katalysiert. Eine derartige RNA-Ligase ist im Handel erhältlich (zum Beispiel Life Technologies – GIBCO BRL Ref. 18003). Die cDNAs können daher schließlich mit herkömmlichen Techniken (zum Beispiel PCR) unter Verwendung geeigneter Primer amplifiziert

werden, wie es in [Fig. 3](#) veranschaulicht ist. Diese Technik ist besonders für die Klonierung von kleiner RNA (unter 1000 b) geeignet.

[0050] Ein anderer Versuchsansatz für die Klonierung und/oder Identifizierung der spezifischen RNA-Regionen besteht zum Beispiel aus Durchführung einer inversen Transkription mit dem Produkt des Verdau mit einem Enzym, das für an Doppelsträngen beteiligte RNA spezifisch ist, wie die RNase H unter Verwendung von Zufallsprimern, die die Transkription im Innern der RNAs zufällig initiieren. Die erhaltenen cDNAs werden folglich gemäß den herkömmlichen molekularbiologischen Techniken amplifiziert, zum Beispiel mittels PCR, unter Verwendung von Primern durch an den cDNA-Enden hinzugefügte Oligonucleotiden und aufgrund der Wirkung der Phage T4 RNA-Ligase (im Handel erhältlich; zum Beispiel bei Life Technologies – GIBCO BRL Ref. 18003). Diese zweite Technik ist in [Fig. 4](#) und in den Beispielen veranschaulicht. Diese Technik ist ganz besonders für RNAs mit bedeutender Größe geeignet und erlaubt die Gewinnung eines Teils der Sequenzinformation, der hinreichend ist, um später die vollständige Ausgangssequenz wiederherzustellen.

[0051] Ein anderer Versuchsansatz für die Klonierung und/oder Identifizierung der spezifischen RNA-Regionen beruht ebenfalls auf der Durchführung einer inversen Transkription unter Verwendung von Zufallsprimern ([Fig. 4](#)). Jedoch sind gemäß dieser Variante die verwendeten Primer wenigstens zum Teil halbzufällige Primer, nämlich Oligonucleotide, umfassend:

- eine (degenerierte) zufällige Region,
- einen minimalen Priming-Bereich, der ein definiertes zwingendes Maß aufweist, und
- einen stabilisierenden Bereich.

[0052] Vorzugsweise handelt es sich um Oligonucleotide, umfassend in 5'→3' Richtung:

- einen stabilisierenden Bereich, umfassend 8 bis 24 festgelegte Nucleotide, vorzugsweise 10 bis 18 Nucleotide. Dieser stabilisierende Bereich kann selbst einer Sequenz eines Oligonucleotids entsprechen, das für Reamplifizierung der Fragmente verwendet ist, die von den ersten Amplifizierungen stammen, die mit Hilfe der halbzufälligen Primer der Erfindung durchgeführt worden sind. Außerdem kann der stabilisierende Bereich die Sequenz von einer oder mehreren Stellen vorzugsweise nichtpalindromer Art umfassen, die Restriktionsenzymen entsprechen. Dies erlaubt zum Beispiel die Klonierung der daher amplifizierten Fragmente zu erleichtern. Ein besonderes Beispiel für einen stabilisierenden Bereich ist mit der Sequenz GAG AAG CGT TAT (Reste 1 bis 12 der SEQ ID NO:1) dargestellt;
- eine zufällige Region mit 3 bis 8 Nucleotiden, ganz besonders mit 5 bis 7 Nucleotiden, und
- einen definierten minimalen Priming-Bereich, so dass das Oligonucleotid im Durchschnitt wenigstens an alle ungefähr 60 bp, vorzugsweise alle ungefähr 250 bp hybridisiert. Ganz bevorzugt umfasst der Priming-Bereich 2 bis 4 definierte Nucleotide, vorzugsweise 3 oder 4, wie zum Beispiel AGGX, wo X für eine der vier Basen A, C, G oder T steht. Das Vorhandensein eines derartigen Priming-Bereichs verleiht dem Oligonucleotid die Fähigkeit, im Schnitt alle ungefähr 256 Basenpaare zu hybridisieren.

[0053] Ganz besonders bevorzugt handelt es sich um Oligonucleotide mit der Formel:

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGX (SEQ ID NO: 1) wo die festgelegten Basen so angeordnet sind, dass das Hintergrundrauschen aufgrund von Selbstpaarungen in den PCR-Versuchen minimiert ist, wo N anzeigt, dass die vier Basen in zufälliger Weise an der angegebenen Position stehen können, und wo X für eine der Basen A, C, G oder T steht. Derartige Oligonucleotide sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

[0054] In dieser Hinsicht können, um die Möglichkeiten des Primings auf den zu klonierenden RNAs zu erhöhen, gleichzeitige Reaktionen mit Oligonucleotiden durchgeführt werden, wie

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGT (Oligonucleotide A)

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGA (Oligonucleotide B)

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGC (Oligonucleotide C)

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGG (Oligonucleotide G)

wobei jede Population von Oligonucleotiden (A, B, C, D) einzeln oder zusammen mit einer anderen verwendet sein kann.

[0055] Nach dem Schritt der inversen Transkription werden die cDNAs mittels PCR unter Verwendung der Oligonucleotide A oder B oder C oder D amplifiziert.

[0056] Wie oben angegeben, kann entsprechend der erwünschten Komplexität und Spezifität der Population von Oligonucleotiden die Anzahl an degenerierten Positionen zwischen 3 und 8, vorzugsweise zwischen 5 und 7, variieren. Unter 3 sind die Hybridisierungen eingeschränkt und über 8 ist die Population von Oligonucleotiden zu komplex, um eine gute Amplifikation spezifischer Banden zu gewährleisten.

[0057] Überdies kann die Länge des festgelegten 3'-Endes (der zwingende Priming-Bereich) dieser Oligonucleotide ebenfalls modifiziert sein: wenn die oben beschriebenen Primer mit 4 festen Basen im Durchschnitt die Amplifizierung von 256 Basenpaaren erlauben, erlauben die Primer mit 3 festen Basen die Amplifizierung von kürzeren Fragmenten (durchschnittlich 64 Basenpaare). In einer bevorzugten Form der Erfindung verwendet man Oligonucleotide, in denen der Priming-Bereich 4 feste Basen umfasst. In einer anderen bevorzugten Form der Erfindung verwendet man Oligonucleotide mit einem Priming-Bereich aus drei festgelegten Basen. Denn die Exons mit einer Größe von durchschnittlich 137 Basen sind vorteilhaft mit derartigen Oligonucleotiden amplifiziert. In dieser Hinsicht siehe ebenfalls die Oligonucleotide zum Beispiel mit der Sequenz SEQ ID NO: 2, 3 und 4.

[0058] Schließlich werden beim Schritt der Identifizierung und/oder Klonierung der RNA die verschiedenen PCR- und Klonierungsverfahren angewandt, um die ganze und vollständige Information zu erhalten.

Identifizierung und/oder Klonierung aus Heterotriplices.

[0059] Im Fall von Heterotriplices (andere Variante des Verfahrens) zeigen sich Regionen der qualitativen Unterschiede (Insertionen, Deletionen, differentielle Spleißungen) im Wesentlichen in Form von Regionen doppelsträngiger DNA, wie in [Fig. 5](#) dargestellt. Diese Regionen können folglich durch Behandlung in Gegenwart geeigneter Enzyme, wie beispielsweise ein Enzym, das den Verdau der RNAs erlaubt, dann ein Enzym, das den Verdau der einzelsträngigen DNAs erlaubt, identifiziert und kloniert werden. Die so erhaltenen Nucleinsäuren werden folglich direkt in Form von doppelsträngiger DNA erhalten und können in jeden geeigneten Vektor wie zum Beispiel pMos-Blue Vektor (Amersham, RPN 5110) kloniert werden. Diese Methodologie ist von den bereits beschriebenen Versuchsansätzen zu unterscheiden, die RNAs oder Oligonucleotide mit vorbestimmten Sequenzen verwenden und modifiziert sind, um eine Nuclease-Aktivität auszuüben (Landgraf et al. (1994) Biochemistry, 33, 10607-10615).

Identifizierung und/oder Klonierung aus DNA/DNA-Homoduplices (**Fig. 6**).

[0060] Die aufgrund ihrer atypischen Strukturen isolierten Fragmenten werden anschließend an jedem ihrer Enden Adapter oder Linker angefügt, die Restriktionsschnittstellen an jedem ihrer Enden besitzen. Dieser Schritt kann gemäß dem Fachmann bekannten Techniken durchgeführt sein, zum Beispiel durch Ligation mit der DNA-Ligase des T4 Phagen. Die so eingeführten Restriktionsstellen sind mit den Stellen der cDNA-Fragmente kompatibel gewählt. Die eingeführten Linker sind doppelsträngige cDNA-Sequenzen, bekannte Sequenzen, die die Ableitung von Primern erlauben, um enzymatische Amplifikationen (PCR) durchzuführen. Da der nachfolgende Schritt aus der Amplifikation der beiden Stränge besteht, die beiden Stränge zu amplifizieren, die zwischen denen die zu identifizierenden qualitativen Unterschiede vorliegen, ist es erforderlich Linker zu verwenden, deren 5'-Enden phosphoryliert sind. Daher ist nach thermischer Denaturierung der doppelsträngigen cDNA mit angefügten Linkern jedes der Enden dieser cDNA kovalent mit einer spezifischen Priming-Sequenz verbunden. Nach PCR mit Hilfe geeigneter spezifischer Primer werden zwei Kategorien doppelsträngiger cDNA erhalten: Fragmente, die Sequenzen enthalten, die für qualitative Unterschiede, die die beiden physiopathologischen Situationen unterscheiden, spezifisch sind, und Fragmente, die den negativen Abdruck dieser Spleißereignisse umfassen. Die Klonierung dieser Fragmente erlaubt die Bildung einer Bank von alternativen Spleißungen, in der für jedes Spleißereignis positive und negative Abdrücke vorhanden sind. In dieser Bank sind folglich nicht nur die alternativen Exons und Introns sondern auch die spezifischen Verknüpfungen zugänglich, die durch Ausschneiden dieser gespleißten Sequenzen gebildet sind. In einer selben Bank können die verschiedenen genetischen Informationen von zwei physiopathologischen Situationen ohne Unterschied stammen. Überdies können, um den unterschiedlichen Charakter der identifizierten Spleißungen zu verifizieren und um zu bestimmen, von welcher Situation diese spezifisch stammen, die Klone der Bank mit Sonden hybridisiert werden, die von jeder der mRNA-Gesamtpopulationen stammen.

[0061] Zwei Hauptverwendungen können für die cDNA-Fragmente in Betracht gezogen werden, die von identifizierten qualitativen Unterschieden stammen:

- Ihre Klonierung in geeigneten Vektoren, um Banken herzustellen, die für qualitative Unterschiede repräsentativ sind, die zwischen zwei untersuchten physiopathologischen Situationen vorhanden sind,
- Ihre Verwendung als Sonden, um eine DNA-Bank zu durchmustern, was die Identifizierung der Spleißereignisse differentieller Art erlaubt.

[0062] Die in der Erfindung verwendeten Vektoren können insbesondere Plasmide, Cosmide, Phagen, YAC, HAC etc. sein. Diese Nucleinsäuren können daher als solche konserviert sein oder in Mikroorganismen eingeführt werden, die für den verwendeten Klonierungsvektor geeignet sind, um als Kulturen vervielfacht und/oder

aufbewahrt zu werden.

[0063] Die wie oben beschriebenen Verfahren werden im Allgemeinen für jede Probe in einem Zeitraum von weniger als zwei Monate, insbesondere weniger als 6 Wochen, durchgeführt. Überdies können diese verschiedenen Verfahren automatisiert werden, um den Gesamtdauer zu verkürzen und die Behandlung vieler Proben zu erleichtern.

[0064] In dieser Hinsicht betrifft ein anderer Gegenstand der Erfindung die Nucleinsäuren, die mit diesen Verfahren der Erfindung identifiziert und/oder kloniert sind. Wie oben angegeben, können diese Nucleinsäuren RNA oder cDNA sein.

[0065] Allgemeiner, die Erfindung betrifft eine Zusammensetzung von Nucleinsäuren, umfassend hauptsächlich Nucleinsäuren, die zwei physiologische Situationen unterscheidende alternative Spleißungen entsprechen. Ganz besonders entsprechen diese Nucleinsäuren den in einer biologischen Testprobe identifizierten alternativen Spleißungen und die nicht in derselben biologischen Probe in einer Referenzsituation vorhanden sind. Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von klonierten Nucleinsäuren als therapeutisches oder diagnostisches Produkt oder als Werkzeug für das Screening von aktiven Molekülen, wie unten angegeben.

[0066] Die oben dargelegten verschiedenen Verfahren führen folglich alle zu einer Klonierung von cDNA-Sequenzen, die die differentiell gespleißte genetische Information zwischen zwei physiopathologischen Situationen repräsentieren. Die Gesamtheit der Klone, die aus einem dieser Verfahren hervorgegangen sind, erlaubt folglich die Bildung einer Bank, die für qualitative Unterschiede repräsentativ ist, die zwischen zwei untersuchten Situationen vorhanden sind.

Generierung qualitativer Banken

[0067] In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung außerdem ein Verfahren zur Herstellung einer Bank von Nucleinsäuren, die für einen bestimmten physiologischen Zustand einer biologischen Probe repräsentativ sind. Dieses Verfahren umfasst vorteilhaft die Klonierung von Nucleinsäuren, die für qualitative Marker der genetischen Expression (zum Beispiel alternative Spleißungen) des besagten physiologischen Zustands repräsentativ sind und nicht in einem Referenzzustand gezeigt sind, in Banken, die für qualitative Unterschiede, die zwischen den beiden untersuchten Zuständen vorhanden sind, spezifisch sind.

[0068] Diese Banken sind aus cDNAs gebildet, die in Plasmid- oder Phagenvektoren inseriert sind. Diese Banken können auf Nitrocellulose-Filtern oder jedem anderen dem Fachmann bekannten Träger wie Chips oder Biochips präsentiert sein.

[0069] Ein Merkmal und gleichzeitig die Neuartigkeit des qualitativen differentiellen Screenings ist, dass diese Technik nicht zu einer sondern vorteilhaft zu zwei unterschiedlichen Banken führt, die die Gesamtheit der qualitativen Unterschiede repräsentieren, die zwischen zwei bestimmten Situationen bestehen: ein Banken-Paar (siehe [Fig. 1D](#)).

[0070] Daher betrifft die Erfindung bevorzugt jede Zusammensetzung oder Bank von Nucleinsäuren, die durch Hybridisierung von einer Population von RNA, die von einer biologischen Probe stammt, und einer Population von cDNA, die von einer zweiten biologischen Probe stammt, erhalten werden kann. Bevorzugter umfassen die Banken oder die Zusammensetzungen der Erfindung Nucleinsäuren, die für qualitative Unterschiede der Expression zwischen zwei biologischen Proben repräsentativ sind, und mit einem Verfahren hergestellt sind, umfassend (i) einen Schritt wenigstens der Hybridisierung von einer Population von RNA, die von einer ersten biologischen Probe stammt, und einer Population von cDNA, die von einer zweiten biologischen Probe stammt, (ii) die Selektion der für qualitative Unterschiede der Expression repräsentativen Nucleinsäuren und eventuell (iii) die Klonierung besagter Nucleinsäuren.

[0071] Außerdem ist es nach Bildung derartiger Banken möglich, einen Schritt der Selektion der Klone durchzuführen, um die Spezifität der erhaltenen Banken zu verbessern. Daher ist es möglich, dass bestimmte beobachtete Fehlpaarungen aufgrund der qualitativen Unterschiede (z.B. differentielle alternative Spleißungen) nicht einzigartig sind, sondern zum Beispiel aus einem Fehler oder Fehlern der inversen Transkription resultieren könnten. Obwohl diese Ereignisse im Allgemein nicht signifikant sind, werden sie vorzugsweise vor der Klonierung der Nucleinsäuren vermindert oder eliminiert. Hierfür können die Klone der Bank mit den cDNA-Populationen der beiden untersuchten physiopathologischen Situationen hybridisiert werden (siehe Schritt (c)

oben). Die Klone, die nicht mit den beiden Populationen unterschiedlich hybridisieren, können als nichtspezifisch betrachtet und eventuell eliminiert werden oder mit verringerter Priorität behandelt werden (denn das Auftreten einer neuen Isoform in der Testprobe besagt nicht immer, dass die Isoform, die anfangs in der Referenzprobe vorlag, aus dieser Testprobe verschwunden ist.) Die Klone, die nur mit einer der beiden Populationen oder bevorzugt mit einer der Populationen hybridisieren, werden als spezifisch betrachtet und können mit erster Priorität ausgewählt werden, um angereicherte oder gesäuberte Banken zu bilden.

[0072] Eine Säuberung kann ebenfalls mittels Hybridisierung und Validierung von Klonen mit Sonden durchgeführt werden, die von einer statistisch relevanten Anzahl an pathologischen Proben abstammen.

[0073] Die vorliegende Anmeldung beschreibt ebenfalls jede Nucleinsäure-Bank, die Nucleinsäuren umfasst, die für eine physiologische Situation charakteristische alternative Spleißungen spezifisch sind. Im Allgemeinen sind diese Banken vorteilhaft aus doppelsträngiger cDNA gebildet, die RNA-Regionen entsprechen, die für eine alternative Spleißung spezifisch ist. Diese Banken können aus Nucleinsäuren gebildet sein, im Allgemeinen in einem Klonierungsvektor oder in Zellkulturen, die besagte Nucleinsäuren enthalten.

[0074] Die Auswahl der Ausgangs-RNA bestimmt zum Teil die Charakteristika der erhaltenen Banken:
– die RNAs der beiden Situationen A und B sind mRNAs oder reife Gesamt- RNAs, die gemäß dem Fachmann bekannten Techniken isoliert sind.

[0075] Die Banken sind dann Banken des qualitativen differentiellen Screenings und als beschränkt bezeichnet, denn sie sind auf qualitative Unterschiede beschränkt, die die reifen RNAs der beiden physiopathologischen Situationen charakterisieren.

[0076] Die RNAs der einen Situation sind reife mRNAs oder Gesamt-RNAs, während die RNAs der anderen Situation Prä-messenger-RNAs sind, die durch Spleißung gereift ist und gemäß dem Fachmann bekannten Techniken aus Zellkernen isoliert ist. In diesem Fall werden die erhaltenen Banken des differentiellen Screenings als komplex bezeichnet, da sie nicht auf Unterschiede zwischen reifen RNAs beschränkt sind, sondern sie umfassen das gesamte Repertoire der Spleißungen, die in einer Situation transkribiert und in der anderen eliminiert sind, darunter die gesamten Introns.

[0077] schließlich können die RNAs von einer einzigen physiopathologischen Situation stammen und in diesem Fall umfasst das differentielle Screening die reifen mRNAs und die Prä-messenger-RNA von einer gleichen Probe. In diesem Fall sind die erhaltenen Banken autologe Banken des qualitativen differentiellen Screenings. Der Nutzen dieser Banken ist, dass sie ausschließlich das Repertoire der transkribierten Introns in einer bestimmten Situation versammeln. Ihre Hybridisierung mit einer Sonde, die von reifen RNAs einer anderen Situation stammt, bestimmt schnell, ob diese Situation durch Zurückbleiben von Introns charakterisiert ist, was ihre Identifizierung leicht erlaubt.

[0078] Im Allgemeinen sind die Banken durch Ausbreiten einer mit diesen klonierten Nucleinsäuren transformierten Zellkultur auf einem festen Medium (besonders gelartigen Medium) generiert. Die Transformation wird mit jeder dem Fachmann bekannten Technik (Transfektion, Calciumphosphat, Elektroporation, Infektion mit Bakteriophagen, etc.) durchgeführt. Die Zellkultur ist im Allgemeinen eine Bakterienkultur wie zum Beispiel E. coli Bakterien. Es kann sich ebenfalls um eukaryotische Zellkulturen, insbesondere um niedere eukaryotische Zellen (zum Beispiel Hefen) handeln. Dieses Ausbreiten kann in einer Schale oder auf jedem anderen geeigneten Träger unter Sterilbedingungen erfolgen. Außerdem können diese auf gelartigem Medium ausgebrachte Kulturen zum Beispiel in gefrorener Form (zum Beispiel in Glycerin oder einem anderen geeigneten Agens) aufbewahrt sein. Diese Banken können natürlich für die Herstellung von „Replika“, nämlich von Kopien entsprechend üblicher Techniken, die unten genauer beschrieben werden, verwendet sein. Außerdem dienen diese Banken im Allgemeinen zur Herstellung amplifizierter Banken, nämlich jeden Klon in amplifizierter Form enthaltende Banken. Eine amplifizierte Bank wird folgendermaßen hergestellt: aus den ausgebreiteten Kulturen werden alle Zellklone wiedergewonnen und werden konditioniert, um gefroren oder in der Kälte in jedem geeigneten Medium konserviert zu werden. Diese amplifizierte Bank wird vorteilhaft aus E. coli Bakterienkulturen hergestellt und bei 4°C unter Sterilbedingungen konserviert. Diese amplifizierte Bank erlaubt die Herstellung und unbegrenzte Reproduktion jeder späteren Bank, die diese Klone umfasst, auf unterschiedlichen Trägern für verschiedene Anwendungen. Eine derartige Bank erlaubt außerdem die Isolierung und Charakterisierung eines jeden Klons von Interesse. Jeder der Klone, die die Banken der Erfindung bilden, ist daher ein charakteristisches Element einer physiologischen Situation und bildet folglich ein besonders interessantes Ziel für verschiedene Untersuchungen wie die Suche nach Markern, die Herstellung von Antikörpern, die Diagnose, die Behandlung für den Gentransfer, etc. Diese unterschiedlicher Anwendungen werden noch genauer weiter un-

ten diskutiert. Die Bank wird im Allgemeinen, wie oben beschrieben, durch Ausbreiten der Kulturen in einem gelartigen Medium auf einem geeigneten Träger (zum Beispiel Petri-Schale) hergestellt. Der Vorteil bei der Verwendung eines gelartigen Mediums ist der, dass jede Kolonie separiert und vereinzelt werden kann. Aus dieser Kultur können identische Replika in großen Mengen durch einfaches „replizieren“ auf jedem geeigneten Träger gemäß dem Fachmann bekannten Techniken hergestellt werden. Daher kann die Replik mittels Filter, Membranen (Nylon, Nitrocellulose, etc.) hergestellt werden, was das Anheften der Kulturen erlaubt. Die Filter können schließlich bei 4°C zum Beispiel in getrockneter Form unter beliebigen Bedingungen aufbewahrt werden, die nicht die Nucleinsäuren verändern. Die Filter können ebenfalls behandelt sein, um die Zellen, Proteine etc. auszuschließen und um nur Bestandteile wie die Nucleinsäuren zu konservieren. Diese Behandlungen können besonders Proteasen, Detergentien etc. umfassen. Die behandelten Filter können ebenfalls in jeder Vorrichtung oder unter jeder Bedingung konserviert werden, die für Nucleinsäuren geeignet sind.

[0079] Die Nucleinsäure-Banken können ebenfalls direkt aus Nucleinsäuren durch Anlagerung auf Biochips oder jeder anderen geeigneten Vorrichtung hergestellt sein.

[0080] Die vorliegende Anmeldung beschreibt ebenfalls jede Bank, umfassend Oligonucleotide, die für zwei physiologische Situationen unterscheidende alternative Spleißungen charakteristisch sind. Es handelt sich vorteilhaft um einzelsträngige Oligonucleotide, umfassend 5 bis 100-mere, vorzugsweise wenigstens 50-mere zum Beispiel ungefähr 25-mere.

[0081] Diese Oligonucleotide sind für alternative Spleißungen spezifisch, die für eine Situation oder einen Typ einer physiologischen Situation repräsentativ sind. Daher können derartige Oligonucleotide zum Beispiel Oligonucleotide sein, die für Apoptosesituationen charakteristische alternative Spleißungen repräsentativ sind. Es ist nämlich in der Literatur beschrieben worden, dass bestimmte alternative Spleißungen im Rahmen apoptotischer Situationen beobachtet wurden. Es handelt sich zum Beispiel um Spleißungen in den Genen Bclx, Bax, Fas und insbesondere Grb2. Aus veröffentlichten Daten und in der Literatur und/oder Datenbanken zugänglichen Sequenzen ist es möglich, für gespleißte und ungespleißte Formen spezifische Oligonucleotide herzustellen. Diese Oligonucleotide können zum Beispiel gemäß folgender Strategie hergestellt sein:

- (a) Identifizierung eines Proteins oder eines Spleißereignisses, das für eine Apoptosesituation und die Sequenz der gespleißten Domäne charakteristisch ist. Diese Identifizierung kann auf den veröffentlichten Daten beruhen oder durch Kompilation von zugänglichen Sequenzen in Datenbanken;
- (b) künstliche Synthese eines oder mehrerer Oligonucleotide, die einer oder mehreren Regionen dieser Domäne entsprechen, die folglich durch Hybridisierung das Aufzeigen der ungespleißten Form in den RNA einer Testprobe erlauben;
- (c) künstliche Synthese eines oder mehrerer Oligonucleotide, die der Verknüpfungsregion zwischen den beiden Domänen, die durch die gespleißte Domäne getrennt sind, entsprechen. Diese Oligonucleotide erlauben folglich durch Hybridisierung das Aufzeigen der gespleißten Form in den RNA einer Testprobe;
- (d) Reproduktion der Schritte (a) bis (c) oben mit anderen Proteinen oder Spleißereignissen, die für eine Apoptosesituation charakteristisch sind;
- (e) Übertragung auf einen ersten geeigneten Träger des oder der Oligonucleotide, die für apoptotische Formen der oben identifizierten Messenger spezifisch sind, und Übertragung auf einen anderen geeigneten Träger des oder der Oligonucleotide, die für nicht-apoptotische Formen spezifisch sind.

[0082] Die beiden so erhaltenen Träger können verwendet werden, um den physiologischen Zustand von Zellen oder Testproben und besonders ihren apoptotischen Zustand durch Hybridisierung eines Nucleinsäure-Präparats von diesen Zellen oder Proben zu testen.

[0083] Andere ähnliche Banken können mit Oligonucleotiden, die für verschiedene physiopathologische Zustände spezifisch sind (Neurodegeneration, Toxizität, Proliferation, etc.) generiert werden und daher eine Vergrößerung des Anwendungsbereichs erlauben.

[0084] Banken von alternativen Introns und Exons können ebenfalls EDV-Datenbanken sein, die mittels systematischer Analyse von Datenbanken gebildet werden, die die auf das Genom irgendeines Organismus, Gewebes oder irgendeiner Zellkultur bezogene Information zusammenfassen. In diesem Fall können die durch Bildung derartiger virtueller Banken gewonnenen Daten verwendet werden, um Oligonucleotid-Primer zu generieren, die zum parallelen Testen beider physiopathologischer Situationen verwendet werden.

[0085] Die EDV-Datenbanken können ebenfalls verwendet werden, um allgemeine Nucleotidsonden abzuleiten, die für eine Klasse von Proteinen repräsentativ sind oder für eine definierte Sequenz noch spezifisch sind. Diese Sonden können schließlich auf Banken von Klonen angewandt werden, die von verschiedenen Klonie-

rungstechniken von alternativen Introns und Exons stammen, um ein Bild der Komplexität dieser molekularen Banken zu erhalten und um schnell zu bestimmen, ob diese oder jene Klasse von Proteinen oder diese oder jene bestimmte Sequenz zwischen zwei verschiedenen physiopathologischen Zuständen differentiell gespleißt ist.

[0086] Eine andere Bank oder Zusammensetzung von Nucleinsäuren gemäß der Erfindung ist eine Antisense-Bank, die aus gemäß den Verfahren der Erfindung (DATAS) identifizierten Sequenzen hergestellt ist. Für die Herstellung dieses Bankentyps werden diese Sequenzen so kloniert, dass sie in RNA-Fragmenten exprimiert werden, die einer Antisense-Orientierung bezogen auf die Messenger-RNA entsprechen, mit denen eine DATAS durchgeführt worden ist. Man erhält daher eine als Antisense bezeichnete Bank. Dieser Versuchsansatz verwendet vorzugsweise die Klonierungsvariante, die eine Orientierung der klonierten Fragmente erlaubt. Der Nutzen einer derartigen Antisense-Bank ist, dass sie die Transfektion von Zelllinien und die Störung jeden Phänotyps, der entweder morphologischer Art, enzymatischer Art ist oder folglich durch Verwendung von Reporter-genen oder Resistenzgenen gegen ein Selektionsmittel zu verfolgen erlaubt. Die Analyse der Phänotypvariationen, die aus der Einführung eines Antisense-Expressionsvektors herrühren, erfolgen im Allgemeinen nach Selektion stabiler Klone, nämlich die eine koordinierte Vermehrung des Expressionsvektors und des Genoms des Wirts erlauben. Diese Koordination wird durch die Integration des Expressionsvektors in das zelluläre Genom oder, wenn der Expressionsvektor episomal ist, durch Selektionsdruck ermöglicht. Dieser Selektionsdruck entsteht durch Behandlung der transfizierten Zellkultur mit einem toxischen Agens, das nur unschädlich gemacht werden kann, wenn das Produkt eines Gens, das vom Expressionsvektor getragen wird, in der Zelle exprimiert wird. Daraus resultiert eine Synchronisierung zwischen der Replikation des Wirts und der transgenen Zelle. Vorteilhaft verwendet man episomale Vektoren, die vom Epstein-Barr-Virus abstammen, die die Expression in derselben Zelle von 50 bis 100 Kopien des Vektors erlauben (Deiss et al., 1996, EMBO J., 15, 3861-3870; Kissil et al., 1995, J. Biol. Chem., 270, 27932-27936).

[0087] Der Nutzen dieser Antisense-Banken verbunden mit den DATAS-Sequenzen, die sie enthalten, ist nicht nur zu identifizieren, welches Gen in seiner Expression inhibiert worden ist, um den selektierten Phänotyp herbeizuführen, sondern auch um zu identifizieren, durch welche Spleißisoform dieses Gen beeinträchtigt worden ist. Während das Antisense-Fragment auf ein bestimmtes Exon zielt, kann das Fragment davon abgeleitet sein, dass die Proteindomäne und folglich die Funktion, die diese Domäne impliziert, im Gegensatz zum beobachteten Phänotyp steht. Daher stellt die Kopplung von DATAS mit einem Antisense-Versuchsansatz eine Abkürzung verglichen mit dem funktionellen genomischen Ansatz dar.

DNA-Biochips

[0088] Die Erfindung betrifft ebenfalls jeden Träger (Membran, Filter, Biochip, Chip, etc.), der eine Bank oder eine Zusammensetzung von wie oben definierten Nucleinsäuren umfasst. Es kann sich ganz besonders um eine Zellbank oder Nucleinsäure-Bank handeln. Die Erfindung betrifft ebenfalls jedes Kit oder jeden Träger, der mehrere Banken gemäß der Erfindung umfasst. Insbesondere kann es von Vorteil sein, eine Bank, die für Merkmale eines physiologischen Testzustands im Vergleich zu einem physiologischen Referenzzustand repräsentativ ist, und als Kontrolle eine Bank, die für Merkmale des physiologischen Referenzzustands im Vergleich zum physiologischen Testzustand repräsentativ ist, parallel zu verwenden („Banken-Paar“). Ein vorteilhaftes Kit gemäß der Erfindung umfasst folglich zwei differentielle qualitative Banken von zwei physiologischen Situationen (ein „Banken-Paar“). Gemäß einer besonderen Anwendungsform umfassen die Kits der Erfindung mehrere Banken-Paare, wie sie oben definiert sind, die zum Beispiel verschiedenen physiologischen Zuständen oder verschiedenen biologischen Proben entsprechen.

[0089] Die Kits können zum Beispiel diese verschiedenen Banken-Paare umfassen, die in Reihe auf demselben Träger angelagert sind.

Herstellung von Sonden

[0090] Eine andere Verwendung der cDNA-Zusammensetzungen gemäß der Erfindung, die für zwischen zwei physiopathologischen Zuständen vorhandene qualitative Unterschiede repräsentativ sind, besteht in der Ableitung von Sonden. Denn derartige Sonden können zum Screening auf gespleißte Ereignisse verwendet sein, die zwischen zwei physiopathologischen Zuständen verschieden sind.

[0091] Diese Sonden (siehe [Fig. 1D](#)) können durch Markierung der Nucleinsäure-Populationen oder Banken gemäß herkömmlichen Techniken, die dem Fachmann bekannt sind, hergestellt werden. So kann es sich um enzymatische, radioaktive, fluoreszierende, immunologische etc. Markierungen handeln. Vorzugsweise handelt

es sich um eine radioaktive oder fluoreszierende Markierung. Diese Art von Markierung kann zum Beispiel durch Einführen von markierten Nucleotiden in die Nucleinsäure-Population (entweder nach Synthese oder im Verlauf ihrer Synthese) erfolgen, was ihre Erkennung mit herkömmlichen Verfahren erlaubt.

[0092] Eine Anwendung ist folglich das Screening einer klassischen genomischen Bank. Eine derartige Bank kann je nach Vektor, der von einem Phagen oder einem Cosmid stammt, DNA-Fragmente von 10 kb bis 40 kb umfassen. Die Anzahl an Klonen, die mit den mittels DATAS generierten Sonden hybridisieren und für Spleißunterschiede repräsentativ sind, spiegelt folglich ungefähr die Anzahl an Genen wider, die durch diese Spleißvariationen beeinträchtigt sind, je nachdem sie in der einen oder anderen untersuchten Situation exprimiert sind.

[0093] Vorzugsweise werden die Sonden der Erfindung für das Screening einer genomischen cDNA-Bank (im Allgemeinen human) verwendet, die für die Identifizierung von Spleißereignissen geeignet ist. Vorzugsweise ist eine derartige genomische Bank aus DNA-Fragmenten mit begrenzter Größe zusammengesetzt (im Allgemeinen in Vektoren kloniert), um statistisch nur ein differentiell spleißbares Element abzudecken, nämlich ein einziges Exon oder ein einziges Intron. Die genomische cDNA-Bank ist folglich durch Verdau von genomischer DNA mit einem Enzym mit einer auf 4 Basen beschränkten Erkennungsstelle hergestellt, was folglich die Möglichkeit sicherstellt, durch Verdau Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 1 kb zu erhalten. Derartige Fragmente erfordern die Gewinnung von 10^7 Klonen, um eine DNA-Bank zu bilden, die für ein Genom eines höheren eukaryotischen Organismus repräsentativ ist. Eine derartige Bank ist ebenfalls ein Gegenstand der vorliegenden Anmeldung. Diese Bank wird anschließend mit Sonden hybridisiert, die aus dem qualitativen differentiellen Screening stammen. Genauer, von jeder betrachteten Probe und die zwei physiopathologische Situationen A und B vergleicht, werden zwei Sonden (Sonden-Paar) erhalten. Eine Sonde, die an charakteristischen Spleißereignissen der Situation A angereichert ist, und eine Sonde, die an Spleißmarkern von B angereichert ist. Die Klone der genomischen Bank, die bevorzugt mit der einen oder der anderen Sonde hybridisieren, tragen in den entsprechenden physiopathologischen Situationen bevorzugt gespleißte Sequenzen.

[0094] Die Verfahren der Erfindung erlauben daher die systematische Identifizierung von qualitativen Unterschieden der Genexpression. Diese Verfahren weisen zum Beispiel bei der Identifizierung und/oder Klonierung von Molekülen von Interesse, in der Toxikologie, in der Pharmakologie oder auch in der Pharmakogenomie zahlreiche Anwendungen auf.

Anwendungen

[0095] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Anwendung von oben beschriebenen Verfahren, Nucleinsäuren oder Banken zur Identifizierung von Molekülen von therapeutischem oder diagnostischen Nutzen. Die Erfindung betrifft ganz besonders die Anwendung von oben beschriebenen Verfahren, Nucleinsäuren oder Banken zur Identifizierung von Proteinen oder Protein-Domänen, die von einer Krankheit beeinträchtigt sind.

[0096] Einer der Trümpfe dieser Techniken ist daher, innerhalb eines Messengers und infolgedessen des entsprechenden Proteins, die funktionellen Domänen zu identifizieren, die von einer gegebenen Krankheit beeinträchtigt sind. Dies erlaubt, einer bestimmten Domäne eine Bedeutung bei der Entwicklung oder Aufrechterhaltung eines pathologischen Zustands zuzuschreiben. Der unmittelbare Vorteil, die Wirkung einer pathologischen Deregulation auf eine genaue Domäne eines Proteins zu beschränken, ist diese als ein wichtiges Ziel für ein Screening von kleinen Molekülen für therapeutische Zwecke vorzuschlagen. Diese Informationen schaffen ebenfalls die Voraussetzung, Polypeptide für eine mittels Gentechnik zu überbringende therapeutische Aktivität zu konstruieren. Diese Polypeptide können besonders einzelkettige Antikörper sein, die von neutralisierenden Antikörpern abstammen und gegen die mit den oben beschriebenen Techniken identifizierten Domänen gerichtet sind.

[0097] Spezifischer, die Verfahren gemäß der Erfindung erlauben die Gewinnung von Molekülen, wobei diese können:

- codierende Sequenzen sein, die von alternativen Exons abstammen,
- nicht-codierenden Sequenzen entsprechen, die von differentiell gespleißten Introns von einem physiopathologischen Zustandes auf einen anderen getragen werden.

[0098] Aus diesen beiden Punkten können verschiedene Lehren gezogen werden.

[0099] Die alternativen Spleißungen von Exons, die beide physiopathologische Zustände unterscheiden, geben ein neues Regulationsniveau der genetischen Expression wieder, das erlaubt, eine oder mehrere Funkti-

onen eines bestimmten Proteins zu modulieren (genauer abschalten oder einschalten). Wobei daher die meisten strukturellen oder funktionellen Domänen (SH2, SH3, PTB, PDZ und die katalytischen Domänen von verschiedenen Enzymen) von mehreren benachbarten Exons codiert sind, können sich zwei Konfigurationen ergeben:

- i) Die Domänen sind in der pathologischen Situation verkürzt (Zhu, Q. et al., 1994, J. Exp. Med., vol. 180, Nr. 2, Seiten 461-470); was darauf hinweist, dass die Signalwege, die diese Domänen umfassen, für therapeutische Zwecke wiederhergestellt sein müssen.
- ii) Die Domänen sind im Verlauf einer Krankheit aufrechterhalten, während sie in einer gesunden Situation fehlen; diese Domänen können als Ziele für ein Screening kleiner chemischer Moleküle betrachtet werden, die als Antagonisten für die auf dem Weg über diese Domänen transduzierten Signale bestimmt sind.

[0100] Die differentiell gespleißten Domänen können den nicht-codierenden Regionen, die in 5' oder 3' von der codierenden Sequenz liegen, oder Introns entsprechen, die zwischen zwei codierenden Exons liegen. In den nicht-codierenden Regionen können diese differentiellen Spleißungen eine Modifikation der Stabilität oder der Translatierbarkeit des Messengers wiedergeben (Bloom, T. J. und Beavo, J. A., 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 93, Nr. 24, Seiten 14188-14192; Ambartsumian, N. et al., 1995, Gene, vol. 159, Nr. 1, Seiten 125-130). Diese Phänomene müssen nun auf Basis dieser Informationen gesucht werden und können aufzeigen, dass die Anhäufung oder das Verschwinden des entsprechenden Proteins dieses folglich zu einem Ziel von Interesse macht. Wenn ein Intron in einer codierenden Sequenz zurückbleibt, ergibt sich hieraus am häufigsten eine Verkürzung des natürlichen Proteins durch eine Einführung eines Stop-Codons in den Leserahmen (Varesco, L., et al., 1994, Num. Genet., vol. 93, Nr. 3, Seiten 281-286; Canton, H., et al., 1996, Mol. Pharmacol., vol. 50, Nr. 4, Seiten 799-807; Ion, A., et al., 1996, Am. J. Hum. vol. 58, Nr. 6, Seiten 1185-1191). Vor Erreichen dieses Stop-Codons erfolgt im Allgemeinen ein Ablesen einiger zusätzlicher Codons, was dazu führt, dass an den bereits gelesenen Teil eine spezifische Sequenz, ein Protein-Marker der alternativen Spleißung, angefügt wird. Diese zusätzlichen Aminosäuren können zur Erzeugung von Antikörpern verwendet sein, die für die alternative Form, die für die pathologische Situation charakteristisch ist, spezifisch sind. Diese Antikörper können dann als Diagnosemittel verwendet sein. Das verkürzte Protein zeigt seine modifizierten, sogar gestörten Eigenschaften. Daher können Enzyme um ihre katalytische Domäne oder ihre regulatorische Domäne verkürzt sein und werden inaktiviert oder konstitutiv aktiviert. Adaptoren können ihre Fähigkeit verlieren, verschiedene Partner einer Signalkaskade zu verbinden (Watanabe, K. et al., 1995, J. Biol. Chem., vol 270, Nr. 23, Seiten 13733-13739). Die Spleißprodukte des Empfängers können zu Rezeptoren führen, die ihre Fähigkeit zur Ligandbindung verloren haben (Nakajima, T. et al., 1996, Life Sci., vol 58, Nr. 9, Seiten 761-768) und können ebenfalls Rezeptorformen erzeugen, die durch Ausfällen ihrer extrazellulären Domäne löslich werden (Cheng J., 1994, Science, vol. 263, Nr. 5154, Seiten 1759-1762). In diesem Fall können die diagnostischen Tests in Betracht gezogen werden, die auf der Zirkulation der löslichen Form eines Rezeptors für einen bestimmten Liganden in verschiedenen physiologischen Flüssigkeiten beruhen.

[0101] Die Erfindung betrifft ganz besonders die Anwendung von oben beschriebenen Verfahren, Nucleinsäuren oder Banken zur Identifizierung antigener Domänen, die für an einer Krankheit beteiligte Proteine spezifisch sind. Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von oben beschriebenen Nucleinsäuren, Proteinen oder Peptiden für die Diagnose von Krankheiten.

[0102] Die Erfindung betrifft ebenfalls ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Produktion von Proteinen oder Protein-Domänen, die an einer Krankheit beteiligt sind, umfassend:

- (a) die Hybridisierung der Messenger-RNAs einer pathologischen Probe mit den cDNAs einer gesunden Probe, oder umgekehrt oder beides parallel,
- (b) die Identifizierung, in den gebildeten Hybriden, der Regionen, die qualitativen Unterschieden (ungepaarte (RNA) oder gepaarte (doppelsträngige DNA)) entsprechen und für den pathologischen Zustand verglichen mit dem gesunden Zustand spezifisch sind,
- (c) die Identifizierung und/oder Produktion des Proteins oder der Protein-Domäne, die einer oder mehreren in (b) identifizierten Regionen entsprechen. Die identifizierten Regionen entsprechen im Allgemeinen differentiellen Spleißungen, aber es kann sich ebenfalls um andere genetische Störungen handeln, wie zum Beispiel Insertion(en) oder Deletion(en).

[0103] Das oder die Proteine oder Protein-Domänen können isoliert, sequenziert und in therapeutischen oder diagnostischen Anwendungen insbesondere für die Herstellung von Antikörpern verwendet werden.

[0104] In einem spezifischeren Beispiel erlaubt das qualitative differentielle Screening vorteilhaft das Aufzeigen von Suppressorgen für Tumoren. Denn zahlreiche Beispiele weisen darauf hin, dass eine der Inaktivierungsmöglichkeiten von Suppressorgen im Verlauf der Tumورprogression eine Inaktivierung durch die Mo-

dulation von alternativen Spleißformen ist.

[0105] Daher ist in dem kleinzelligen Lungenkarzinom das Gen des Proteins p130, das zur RB-Familie (Retinoblastom-Protein) gehört, an der Konsensusstelle der Spleißung mutiert. Die Folge dieser Mutation ist die Eliminierung des Exons 2 und eine ausbleibende Synthese des Proteins aufgrund des Vorhandenseins eines frühen Stop-Codons. Diese Beobachtung ist die erste gewesen, die die Bedeutung der Mitglieder der RB-Familie in der Tumorgenese unterstreicht. Ebenso ist bei bestimmten nichtkleinzelligen Lungenkarzinomen das Gen des Proteins p16INK4A, das ein Inhibitor der cyclin-abhängigen Kinasen cdk4 und cdk6 ist, in einer Donorstelle der Spleißung mutiert. Das Resultat dieser Mutation ist die Produktion eines verkürzten Proteins mit einer kurzen Halbwertszeit, was die Akkumulation von inaktiven phosphorylierten Formen von RB zur Folge hat. Überdies ist WT1, das Suppressorgen des Wilms Tumors, in mehrere Messenger-RNAs transkribiert, die durch alternative Spleißungen generiert werden. Beim Brustkrebs sind die relativen Verhältnisse der verschiedenen Varianten bezogen auf gesundes Gewebe verändert, was Diagnosemittel und Spuren liefert, um die Bedeutung der verschiedenen funktionellen Domänen von WT1 bei der Tumorprogression zu verstehen. Dasselbe Phänomen der Modifikation der Verhältnisse zwischen verschiedenen Formen von Messenger-RNA und Protein-Isoformen während der Zelltransformation findet sich beim Neurofibrin NF1 wieder. Außerdem wird diese Vorstellung von der Modulation der Spleißphänomene, die die Tumorprogression kennzeichnet, ebenfalls von dem Beispiel von HDM2 gestützt, von dem 5 alternative Spleißungen in den Ovarial- und Pankreaskarzinomen detektiert sind und deren Expressionen entsprechend die Tumorentwicklung verstärken. Andererseits umfasst bei den Krebsarten des Schädels und Hals einer dieser Inaktivierungsmechanismen von p53 eine Mutation in einer Konsensusstelle der Spleißung.

[0106] Diese einige angeführten Beispiel veranschaulichen den ganzen Nutzen der Techniken der Erfindung, die auf der systematischen Suche von Spleißvariationen basieren, die einen bestimmten Tumor von benachbartem gesunden Gewebe unterscheiden. Die Ergebnisse, die sich daraus ergeben; erlauben tatsächlich nicht nur die Charakterisierung von schon bekannten Tumorsuppressorgen sondern ebenfalls, unter Berücksichtigung des neuen und systematischen Aspekts der Techniken des qualitativen differentiellen Screenings, die Identifizierung von neuen Spleißvariationen, die für Tumoren spezifisch sind, die wahrscheinlich neue Tumorsuppressorgene beeinträchtigen.

[0107] Ebenfalls Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Tumorsuppressorgen oder genetischen Störungen (z.B. Spleißungen) innerhalb der Tumorsuppressorgene, wie es oben definiert ist. Dieses Verfahren kann vorteilhaft die folgenden Schritte umfassen:

- (a) die Hybridisierung der Messenger-RNAs einer Tumorphobie mit den cDNAs einer gesunden Probe, oder umgekehrt oder beide parallel,
- (b) die Identifizierung, in den gebildeten Hybriden, der Regionen, die für die Tumorphobie im Vergleich zum gesunden Zustand spezifisch sind,
- (c) die Identifizierung und/oder Klonierung des Proteins oder der Protein-Domäne, die einer oder mehreren in (b) identifizierten Regionen entsprechen.

[0108] Die Tumor supprimierenden Eigenschaften von identifizierten Proteinen oder Domänen können dann in verschiedenen bekannten Modellen getestet werden. Diese Proteine oder ihre native Form (besitzen beobachtete Spleißung in gesundem Gewebe) können dann in therapeutischen oder diagnostischen Anwendungen insbesondere in einer antitumoralen Gentherapie verwendet werden.

[0109] Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind folglich nicht nur die verschiedenen Aspekte der Anwendung der Technologie sondern auch die Nutzung der Informationen, die sich daraus ableiten lassen, für Zwecke der Suche nach kleinen chemischen Molekülen, der Entwicklung von Screenings auf kleine chemische Moleküle, der Entwicklung für Werkzeuge der Gentherapie oder Diagnose.

[0110] Aus diesem Grund betrifft die Erfindung ebenfalls die Anwendung von oben beschriebenen Verfahren, Nucleinsäuren oder Banken in der Gentoxikologie, nämlich um das toxische Potenzial von Testverbindungen vorwegzunehmen (vorherzusagen).

[0111] Die genetischen Programme, in die während der Behandlung von Zellen oder Geweben mit toxischen Mitteln eingegriffen wird, sind größtenteils mit Phänomenen der Apoptose oder dem programmierten Zelltod korreliert. Die Bedeutung der Phänomene der alternativen Spleißung bei Regulation dieser Apoptosewege ist in der Literatur gut erläutert. Doch bis heute erlaubte keine beschriebene genomische Technologie die systematische Suche und die erschöpfende die Isolierung der Sequenzvariationen aufgrund alternativer Spleißungen und die Unterscheidung zwischen zwei bestimmten physiopathologischen Situationen. Die in der vorlie-

genden Erfindung entwickelten Techniken des qualitativen differentiellen Screenings erlauben die Zusammenfassung der gesamten Spleißunterschiede, die zwischen zwei Situationen in cDNA-Banken bestehen. Der Vergleich der RNA-Sequenzen (zum Beispiel Messenger-RNA) eines mit einer toxischen Referenzverbindung behandelten oder nichtbehandelten Gewebes (oder einer Zellkultur) erlaubt die Etablierung von cDNA-Banken, die die qualitativen Unterschiede der Genexpression zusammenfassen, die die untersuchte toxische Wirkung kennzeichnen. Diese cDNA-Banken können dann mit Sonden hybridisiert werden, die von RNA-Extrakt derselben Gewebe oder Zellen abgeleitet sind, die mit einem chemischen Produkt behandelt sind, dessen toxisches Potenzial man bestimmen möchte. Die mehr oder weniger große Fähigkeit dieser Sonden, sich mit den genetischen Informationen zu hybridisieren, die für eine toxische Referenzsituation spezifisch sind, erlaubt dieser ein toxisches Potenzial zuzuweisen. Außer der Anwendung von DATAS zur Generierung und Verwendung von Banken von qualitativen Unterschieden, die von toxischen Agentien induziert sind, besteht überdies ein Teil der Erfindung ebenfalls darin, zu zeigen, dass Deregulationen in der Spleißung von bestimmten Messenger-RNAs von bestimmten toxischen Agentien induziert werden können, und zwar in niederen Dosen als IC50, die in dem Fachmann bekannten Cytotoxizitätstests und Apoptosetests gemessen werden. Derartige Deregulationen (oder Fehlregulationen) können als Marker für das Verfolgen der Toxizität und/oder Wirksamkeit von (chemischen oder genetischen) Molekülen verwendet sein.

[0112] Die Erfindung betrifft folglich ebenfalls jedes Verfahren zur Detektion oder zum Verfolgen des toxischen und/oder therapeutischen Potenzials einer Verbindung, beruhend auf der Detektion von Spleißformen und/oder Spleißmustern, die von dieser Verbindung in einer biologischen Probe induziert sind. Die Erfindung betrifft außerdem die Verwendung jeder Modifikation von Spleißformen und/oder Spleißmustern als Marker für das Verfolgen der Toxizität und/oder Wirksamkeit von Molekülen.

[0113] Die Bewertung oder das Verfolgen des toxischen Potenzials kann ganz besonders gemäß zwei Versuchsansätzen erfolgen:

Gemäß dem ersten Versuchsansatz kann das qualitative differentielle Screening durchgeführt sein zwischen einem Gewebe oder einer Zellkultur als Referenz, einerseits unbehandelt und andererseits mit dem Produkt behandelt, dessen Toxizität man zu bewerten wünscht. Die Analyse der Klone, die die qualitativen Unterschiede repräsentieren, die spezifisch von dem Produkt induziert sind, erlauben dann möglicherweise die Detektion von Ereignissen in diesen Klonen, die für cDNA charakteristisch sind, die an den mit der Toxizität verbundenen Phänomenen wie die Apoptose beteiligt sind.

[0114] Das Auftreten dieser Marker hängt von der Dosis und der Dauer der Behandlung mit dem Produkt ab und erlaubt eine Näherung seines toxikologischen Profils.

[0115] Gegenstand der vorliegenden Anmeldung ist folglich ebenfalls ein Verfahren zur Identifizierung, mittels qualitativen differentiellen Screenings gemäß den oben angeführten Techniken, von Toxizitätsmarkern, die in einem biologischen Modellsystem von einer chemischen Verbindung induziert sind, deren toxisches Potenzial man testen möchte. In dieser Hinsicht betrifft die vorliegende Erfindung besonders ein Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäuren, die für einen toxischen Zustand einer bestimmten biologischen Probe spezifisch sind, umfassend die Präparation qualitativer differentieller Banken zwischen den cDNAs und RNAs der Probe nach oder ohne Behandlung mit einer Testverbindung und die Suche nach Toxizitätsmarkern, die für Eigenschaften der Probe nach Behandlung spezifisch sind.

[0116] Gemäß einem zweiten Versuchsansatz sammeln Nomogramme für unterschiedliche Klassen toxischer Produkte deren Toxizitätsprofil gemäß den eingesetzten Dosen und gemäß den Behandlungszeiträumen für ein Gewebe oder ein zelluläres Modell als Referenz: Zu jedem Punkt dieser Nomogramme können cDNA-Banken etabliert sein, die für die qualitativen genetischen Unterschiede charakteristisch sind. Diese Banken sind qualitative differentielle Banken, d.h. sie sind durch Gewinnung von genetischen Informationen des in den Nomogrammen gewählten Punkts und des entsprechenden Punkts im Gewebe- oder Zellkontrollmodell erhalten. Wie in den Beispielen veranschaulicht, beruht das qualitative differentielle Screening auf der Hybridisierung von mRNA-Extrakten einer Situation mit den cDNAs, die von einer anderen Situation stammen. Wie weiter oben angegeben, kann das qualitative differentielle Screening ebenfalls aus Gesamt-RNA oder nukleärer RNA, die Prämessenger enthält, durchgeführt werden.

[0117] In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Bestimmung oder Bewertung der Toxizität einer Testverbindung in einer bestimmten biologischen Probe, umfassend die Hybridisierung:

- von differentiellen Banken zwischen den cDNAs und den RNAs besagter biologischen Probe in gesundem Zustand und in verschiedenen Toxizitätsstadien, die aus Behandlung besagter Probe mit einer toxischen Referenzverbindung resultieren, mit

- einem Nucleinsäure-Präparat der mit besagter Testverbindung behandelten biologischen Probe und
- die Bewertung des toxischen Potenzials der Testverbindung durch Analyse des Hybridisierungsgrades mit verschiedenen Banken.

[0118] Gemäß diesem Verfahren werden für jede Situation (Dosis der Verbindung und/oder Inkubationszeit) zwei reziproke Hybridisierungen vorteilhaft durchgeführt, zwischen:

- den RNAs der Situation A (Test) und den cDNAs der Situation B (Referenz) (rA/cB)
- den RNAs der Situation B (Referenz) und den cDNAs der Situation A (Test) (rB/cA).

[0119] Zu jeder toxischen Referenzsituation, zu jedem Punkt der Nomogramme gibt es folglich zwei entsprechende Banken des qualitativen differentiellen Screenings. Eine dieser Banken fasst die qualitativen Variationen zusammen, nämlich besonders alternative Spleißungen, die für die normale Referenzsituation spezifisch sind, während die andere Bank die für toxische Ereignisse spezifischen Spleißungen sammelt. Diese Banken werden auf festen Trägern wie Filter aus Nylon oder Nitrocellulose oder vorteilhaft auf Chips repliziert. Diese anfangs von cDNA-Fragmenten unterschiedlicher Länge gebildeten Banken (entsprechend den betrachteten Spleißereignissen) können durch Verwendung von Oligonucleotiden, die von anfangs isolierten Sequenzen abgeleitet sind, optimiert werden.

[0120] Wenn eine chemische Verbindung für eine pharmazeutische Entwicklung vorgeschlagen wird, kann man sie in denselben Gewebe- oder Zellmodellen einsetzen, wie diejenigen, die im Repertoire der Toxizitäts-nomogramme enthalten sind. Molekularsonden können dann aus mRNA-Extrakten der mit der Verbindung von Interesse behandelten biologischen Proben hergestellt werden. Diese Sonden werden dann auf Filtern hybridisiert, die die cDNA der Banken rA/cB und rB/cA tragen. Zum Beispiel kann die rA/cB Bank die Sequenzen enthalten, die in der normalen Situation vorhanden sind, und die rB/cA Bank die alternativen Spleißelemente enthalten, die für die toxische Situation spezifisch sind. Die Unschädlichkeit oder die Toxizität der chemischen Verbindung wird nun einfach in Abhängigkeit des Hybridisierungsmusters einer Sonde bewertet, die von mRNA-Extrakten des mit der Testverbindung behandelten Gewebe- oder Zellreferenzmodells abgeleitet ist:

- eine wirksame Hybridisierung mit der rA/cB-Bank und kein Signal in der rB/cA-Bank zeigt eine fehlende Toxizität der Verbindung im untersuchten Modell an,
- die Hybridisierung der Sonde mit Klonen der rB/cA-Bank weist auf eine von der Testverbindung induzierte Toxizität.

[0121] Anwendungsbeispiele für die Bildung derartiger Banken können von den Hepatocytenkulturmodellen, wie die HepG2-Linie, von Nierenepithelzellen, wie die HK-2-Linie, oder von Endothelzellen wie die ECV304-Linie bereitgestellt sein, die mit toxischen Mitteln wie Ethanol, Camptothecin oder PMA behandelt sind.

[0122] Ein Beispiel der Wahl kann ebenfalls mit der Verwendung in Kosmetologie von Hautkulturmodellen bereitgestellt sein, die mit toxischen Agentien oder Irritantien behandelt sind oder nicht.

[0123] Gegenstand der vorliegenden Anmeldung sind folglich Banken des differentiellen Screenings (zwischen cDNA und RNA), die aus Organen, Geweben oder Zellkulturen als Referenz hergestellt sind, die mit chemischen Verbindungen behandelt sind, die für große Klassen toxischer Agentien gemäß den in der Literatur beschriebenen Nomogrammen repräsentativ sind. Die Erfindung betrifft auch die Ausbreitung dieser Banken auf Filtern oder Trägern, die dem Fachmann bekannt sind (Nitrocellulose, Nylon...). Vorteilhaft können diese Träger Chips oder Biochips sein, die daher Biochips der Gentoxizität definieren. Die Erfindung betrifft außerdem die Nutzung, die aus der Sequenzierung der verschiedenen Klone gewonnen werden kann, die diese Banken mit dem Zweck bilden, den Mechanismus aufzuklären, der durch die Wirkung der verschiedenen toxischen Agentien in Gang gesetzt wird. wie auch die Verwendung dieser Banken, um sie mit Sonden zu hybridisieren, die von Zellen oder Geweben stammen, die mit einer chemischen Verbindung oder einem pharmazeutischen Produkt behandelt sind, dessen Toxizität man bewerten möchte. Vorteilhaft betrifft die Erfindung wie oben definierte Nucleinsäure-Banken, die aus Hautzellen präpariert sind, die unter verschiedenen toxischen Bedingungen behandelt worden sind. Die Erfindung betrifft außerdem ein Kit, das diese verschiedenen differentiellen Banken der Haut umfasst.

[0124] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Anwendung der wie oben beschriebenen Verfahren, Nucleinsäuren oder Banken für die Bewertung (Vorhersage) oder für die Verbesserung des therapeutischen Potenzials von Testverbindungen (Genopharmakologie).

[0125] Bei dieser Anwendung ist das in der Praxis angewandte Prinzip sehr eng mit dem zuvor beschriebenen Prinzip verwandt. Differentielle Referenz-Banken werden zwischen den cDNAs und den RNAs einer Zellkultur

oder eines Organs in einer Kontrollsituation und ihrem Äquivalent, das ein Krankheitsmodell imitiert, etabliert. Die therapeutische Wirksamkeit eines Produkts kann nun bewertet werden, indem seine Fähigkeit verfolgt wird, den qualitativen Variationen der Genexpression entgegenzuwirken, die für dieses pathologische Modell spezifisch sind. Dies wird durch die Modifikation des Hybridisierungsmusters einer Sonde, die von einem pathologischen Modell stammt, mit einer Referenz-Bank aufgezeigt: ohne Behandlung hybridisiert die Sonde nur mit der Bank, die die für die Krankheit spezifischen Signaturen enthält. Nach Behandlung mit einem wirksamen Produkt hybridisiert die Sonde, obwohl von einem pathologischen Modell abstammend, bevorzugt mit der anderen Bank, die die Signaturen des gesunden äquivalenten Modells trägt.

[0126] In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Bestimmung oder Bewertung der therapeutischen Wirksamkeit einer Testverbindung auf eine bestimmte biologische Probe, umfassend die Hybridisierung:

- von differentiellen Banken zwischen den cDNAs und den RNAs besagter biologischer Probe in gesundem Zustand und in (verschiedenen Entwicklungsstadien des) pathologischen Zustand(s), mit
- einem Nucleinsäure-Präparat der biologischen Probe, die mit besagter Testverbindung behandelt ist, und
- die Bewertung des therapeutischen Potenzials der Testverbindung durch Analyse des Hybridisierungsgrades mit den verschiedenen Banken.

[0127] Ein Beispiel einer derartigen Anwendung kann ein Apoptosemodell liefern, das bestimmte Aspekte der Neurodegeneration imitiert, denen trophische Referenzfaktoren entgegenwirken. Die Zellen, die vom PC12-Phäochromocytom abstammen und im Nervenkörper in Gegenwart von NGF differenziert sind, treten in die Apoptose bei Entfernen des Wachstumsfaktors ein. Diese Apoptose wird von der Expression zahlreicher Marker des programmierten Zelltods begleitet, wovon die meisten durch alternative Spleißungen reguliert sind und deren Auftreten von der IGF1-Wirkung inhibiert wird. Zwei Banken, die von einem qualitativen differentiellen Screening stammen, werden aus mRNA-Extrakten einerseits von differenzierten PC12-Zellen, die durch das Entfernen von NGF in die Apoptose eintreten, und andererseits aus differenzierten PC12-Zellen, die vor der Apoptose durch Zugabe von IGF1 geschützt sind, etabliert. Mit diesen Banken können Sonden hybridisiert werden, die aus mRNA-Extrakten von differenzierten PC12 hergestellt sind, die in die Apoptose eingetreten sind und deren Überleben durch die Behandlung mit einem zu testenden neuroprotektiven Produkt verbessert ist. Die Wirksamkeit der Inversion der qualitativen Charakteristika, die von einer Testverbindung induziert sind, kann folglich mit der Fähigkeit der Sonde abgeschätzt werden, Klone spezifisch zu hybridisieren, die für eine Bank spezifisch sind, die für Zellen repräsentativ ist, deren Überleben verbessert wird. Dieser Test kann später zum Testen der Wirkung von Derivaten von Verbindungen oder von jeder anderen neuen Familie von neuroprotektiven Verbindungen und zur Verbesserung des pharmakologischen Profils gemacht werden.

[0128] In einer besonderen Anwendungsform erlaubt das Verfahren der Erfindung die Wirkung einer neuroprotektiven Testverbindung durch Hybridisierung mit einer

[0129] differentiellen Bank gemäß der Erfindung zwischen einer gesunden Nervenzelle und dieser Zelle, die ein neurodegeneratives Modell darstellt zu bewerten.

[0130] In einer anderen Form wird eine antitumorale Verbindung mit differentiellen Banken getestet, die aus einer Probe von Tumorzellen und einer gesunden Probe etabliert sind.

[0131] Wie oben angegeben, kann das Verfahren der Erfindung außerdem zur Verbesserung der Eigenschaften einer Verbindung verwendet sein, indem verschiedene Derivate auf ihre Fähigkeit getestet werden, ein Hybridisierungsmuster zu induzieren, das dem Muster der Bank, die für die gesunde Probe repräsentativ ist, ähnlich ist.

[0132] Die Erfindung betrifft ebenfalls die Anwendung von oben beschriebenen Verfahren, Nucleinsäuren oder Banken in der Pharmakogenomie d.h. zur Bewertung (Vorhersage) der Reaktion eines Patienten auf eine Testverbindung oder eine Testbehandlung.

[0133] Die Pharmakogenomie hat das Ziel, genetische Profile von Patienten zu erstellen, um zu bestimmen, welche Behandlung in der Lage ist, eine bestimmte Krankheit erfolgreich zu überwinden. Die in der vorliegenden Erfindung beschriebenen Techniken erlauben in dieser Hinsicht die Etablierung von cDNA-Banken, die für qualitative Unterschiede repräsentativ sind, die zwischen einer pathologischen Situation, die auf eine bestimmte Behandlung antwortet, und einer anderen Situation bestehen, die nur wenig oder schlecht antwortet und in der Lage ist, Gegenstand einer anderen Therapiestrategie zu sein. Diese etablierten Referenz-Banken können mit Sonden hybridisiert werden, die aus Messenger-RNAs des Patienten hergestellt sind. Die Hybridisierungs-

ergebnisse ermöglichen herauszufinden, welcher Patient ein Hybridisierungsmuster hat, das der reagierenden Situation oder der nicht reagierenden Situation entspricht und daher so die Therapie auszuwählen.

[0134] In dieser Anwendung ist einerseits das Ziel, abhängig vom Patienten die Behandlung vorzuschlagen, die am geeignetsten ist und die am besten in der Lage ist, erfolgreich zu sein, und andererseits für eine Behandlung die Patienten zu rekrutieren, die am geeignetsten sind, erfolgreich darauf zu reagieren. Wie in den anderen Anwendungen werden zwei Banken des qualitativen differentiellen Screenings hergestellt: eine Bank aus einem Modell oder einer pathologischen Probe, die/das bekanntermaßen auf eine Behandlung reagiert, die andere Bank aus einem anderen Modell oder einer anderen pathologischen Probe, die/das wenig oder schlecht auf die Therapie anspricht. Diese beiden Banken werden dann mit Sonden hybridisiert, die von mRNA-Extrakten von Biopsien von verschiedenen Patienten stammen. Je nachdem diese Sonden mit den alternativen Spleißungen bevorzugt hybridisieren, die für die eine oder die andere Situation spezifisch sind, können die Patienten in Reagierende oder Nichtreagierende auf die Referenzbehandlung unterteilt werden, die die Ausgangsmodelle definiert hat.

[0135] In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung ebenfalls ein Verfahren zur Bestimmung oder Bewertung der Reaktion eines Patienten auf eine Testverbindung oder Testbehandlung, umfassend die Hybridisierung:

- von differentiellen Banken zwischen den cDNAs und der RNAs einer biologischen Probe, die auf besagte Verbindung/Behandlung reagiert, und einer biologischen Probe, die auf besagte Verbindung/Behandlung nicht reagiert oder schlecht reagiert, mit
- einem Nucleinsäure-Präparat einer biologischen Probe des Patienten, und
- die Bewertung des Reaktionspotenzials des Patienten durch Analyse des Hybridisierungsgrades mit den verschiedenen Banken.

[0136] Ein ausgewähltes Beispiel für den Beitrag des qualitativen differentiellen Screenings in der Pharmakogenomie bildet ein qualitatives differentielles Screening zwischen zwei Tumoren desselben histologischen Ursprungs, wobei der eine sich bei der Behandlung mit einer antitumoralen Verbindung zurückbildet (zum Beispiel eine Übertragung einer cDNA, die für das Wildtyp p53-Protein codiert, mit Hilfe der Genterapie) und der andere sich als behandlungsresistent zeigt. Der erste Schritt bei der Bildung von Banken von qualitativen Unterschieden zwischen zwei Situation ist die Bestimmung mittels Analyse der Klone, die diese Banken bilden, welche molekularen Mechanismen bei der Regression des ersten Modells ablaufen und welche im zweiten Modell nicht vorhanden sind.

[0137] Außerdem erlaubt die Verwendung von Filtern oder jedem anderen Träger, der die cDNA dieser Banken präsentiert, die Durchführung von Hybridisierungen mit Sonden, die von mRNA von Tumorbiospien stammen, von denen man die Reaktion auf besagte Behandlung vorhersagen möchte. Diese Ergebnisse erlauben daher eine optimierte Rekrutierung von Patienten in einem klinischen Protokoll.

[0138] Ein besonderes Beispiel für dieses Verfahren ist die Bestimmung der Reaktion des Tumors auf eine Behandlung mit dem Tumorsuppressorgen p53. Denn es ist beschrieben worden, das bestimmte Patienten und bestimmte Tumoren mehr oder weniger auf diese Behandlungsart reagieren (Roth et al., Nature Medicine, 2 (1995) 958). Es ist folglich wichtig, bestimmen zu können, welche Tumorarten und welche Patienten auf eine Behandlung mit der Genterapie mit Wildtyp p53 ansprechen, um die Behandlung zu optimieren und die Rekrutierung der Patienten in den laufenden klinischen Versuchen zu unterstützen. Das Verfahren der Erfindung erlaubt vorteilhaft, diese Schritte zu erleichtern, indem Banken vorgeschlagen werden, die für Merkmale von Zellen spezifisch sind, die auf p53 reagieren und nicht reagieren. Beispiele für p53 sensible oder resistente Zellmodelle sind zum Beispiel von Sabbatini et al. (Genes Dev. 9 (1995) 2184) oder von Roemer et al. (Oncogene 12 (1996) 2069) beschrieben. Die Hybridisierung dieser Banken mit Sonden, die von Biopsien von Patienten stammen, erlaubt eine einfache Bewertung deren Reaktionspotenzials. Außerdem erlauben die spezifischen Banken ebenfalls die Identifizierung der Nucleinsäuren, die an der Reaktion auf p53 beteiligt sind.

[0139] Die vorliegende Anmeldung betrifft ebenfalls die Etablierung von Banken des differentiellen Screenings aus pathologischen Proben oder Krankheitsmodellen, die auf wenigstens ein pharmakologisches Agens unterschiedlich reagieren. Diese Banken können beschränkte, komplexe oder autologe Banken sein, wie sie oben beschrieben sind. Die Erfindung betrifft auch das Ausbreiten dieser Banken auf Filter oder Träger, die dem Fachmann bekannt sind (Nitrocellulose, Nylon...). Vorteilhaft können diese Träger Chips oder Biochips sein; die daher pharmakogenomische Biochips definieren. Die Erfindung bezieht sich auch auf die Nutzung, die aus der Sequenzierung der verschiedenen Klone erhalten werden kann, die diese Banken mit dem Ziel bilden, die Mechanismen aufzuklären, die zu den unterschiedlichen der Reaktionen von pathologischen Proben auf verschiedene Behandlungen führen wie auch die Verwendung dieser Banken, um sie mit Sonden zu hyb-

ridisieren, die von Biopsien von pathologischen Situationen stammen, von denen man die Reaktion auf die Referenzbehandlung vorhersagen möchte, die die Banken definiert.

[0140] Die vorliegende Erfindung beschreibt daher, dass Variationen in den Spleißformen und/oder Spleißmustern Quellen für pharmakogenomische Marker bilden, nämlich Quellen von Markern, die das Aufzeigen der Fähigkeit und der Art und Weise eines Patienten, auf Behandlungen zu reagieren, erlauben. In dieser Hinsicht ist ebenfalls Gegenstand der Erfindung die Verwendung der Intervariabilität, zwischen Individuen, der von alternativen Spleißungen generierten Isoformen (Analyse des Spleißosoms) als Quelle von pharmakogenomischen Markern. Die Erfindung betrifft ebenfalls die Verwendung von Spleißmodifikationen, die von Behandlungen induziert sind, als Quelle von pharmakogenomischen Markern. Daher erlauben, wie oben erklärt, die DATAS Methodologien der Erfindung die Generierung der Nucleinsäuren, die für qualitative Unterschiede zwischen zwei biologischen Proben repräsentativ sind. Diese Nucleinsäuren oder abgeleitete Formen (Sonden, Primer, komplementäre Säuren, etc.) können zur Analyse des Spleißosoms des Individuums im Hinblick auf ein Aufzeigen ihrer Fähigkeit/Art auf Behandlungen zu reagieren oder ihre Prädisposition für eine derartige Behandlung/Krankheit. etc. verwendet sein.

[0141] Diese verschiedenen allgemeinen Beispiele veranschaulichen den Nutzen von Banken des qualitativen differentiellen Screenings bei genotoxischen, genopharmakologischen, pharmakogenomischen Untersuchungen wie auch bei der Suche von diagnostischen oder therapeutischen Zielen von Interesse. Diese Banken stammen von der Klonierung der qualitativen Unterschiede, die zwischen zwei physiopathologischen Zuständen vorliegen. Da eine andere Verwendung der für diese qualitativen Unterschiede repräsentativen cDNAs die Bildung von Sonden ist, die für ein Screening einer genomischen DNA-Bank bestimmt sind, deren Charakteristika oben beschrieben sind, kann ein derartiger Versuchsansatz ebenfalls für jede genotoxische, genopharmakologische, pharmakogenomische Untersuchung wie auch zur Identifizierung des Gens verwendet sein. Zum Beispiel bei den genotoxischen Untersuchungen werden die genomischen Klone, die durch die Größe ihrer Insertionen statistisch auf ein einziges Intron oder auf ein einziges Exon beschränkt sind, auf den Filtern in Abhängigkeit ihrer Hybridisierung mit den DATAS-Sonden klassifiziert, die von der qualitativen differentiellen Analyse zwischen einer Zellpopulation oder einem Gewebe als Referenz und denselben mit einer toxischen Referenzverbindung behandelten Zellen oder Gewebe stammen. Wobei diese für verschiedene Toxizitätsklassen repräsentativen Klone selektiert werden, kann dann eine Hybridisierung dieser Klone mit einer Sonde durchgeführt werden, die von Gesamt-mRNA derselben Zellpopulation oder desselben Gewebes durchgeführt werden, die mit einer Verbindung behandelt worden sind, deren toxisches Potenzial man vorhersagen möchte.

[0142] Weitere Vorteile und Anwendungen der vorliegenden Erfindung sind durch Lektüre der folgenden Beispiel zu erkennen, die als Veranschaulichung und nicht als Beschränkung betrachtet werden sollen. Die Anwendungsbereiche der Erfindung sind in [Fig. 2](#) dargestellt.

LEGENDE DER FIGUREN

[0143] [Fig. 1](#). Schematische Darstellung des differentiellen Screenings gemäß der Erfindung ([Fig. 1A](#)) unter Verwendung einer ([Fig. 1B](#)) oder zwei ([Fig. 1C](#)) Hybridisierungen und Verwendung von Nucleinsäuren ([Fig. 1D](#)).

[0144] [Fig. 2](#). Schematische Darstellung, die die Gewinnung von RNA/DNA-Hybriden beschreibt und die Charakterisierung der einzelsträngigen RNA-Sequenzen, für den pathologischen oder den gesunden Zustand spezifische Signaturen erlaubt.

[0145] [Fig. 3](#). Schematische Darstellung, die ein anderes Mittel beschreibt, das die Isolierung und Charakterisierung mittels Sequenzierung der einzelsträngigen RNA-Sequenzen erlaubt, die für eine pathologische Situation oder eine gesunde Situation spezifisch sind.

[0146] [Fig. 4](#). Schematische Darstellung, die ein anderes Mittel beschreibt, das die Charakterisierung mittels Sequenzierung der ganzen oder eines Teils der einzelsträngigen RNA-Sequenzen erlaubt, die für eine pathologische Situation oder eine gesunde Situation spezifisch sind.

[0147] [Fig. 5](#). Schematische Darstellung, die eine Isolierung der Produkte der alternativen Spleißungen aufgrund der Strukturen der R-Schleife erlaubt.

[0148] [Fig. 6](#). Schematische Darstellung des qualitativen differentiellen Screenings durch Restriktion von Schleifen (Bildung von doppelsträngiger cDNA/cDNA-Homoduplices und Gewinnung der Informationen,

[Fig. 6A](#)) und Beschreibung der gewonnenen Informationen ([Fig. 6B](#)).

[0149] [Fig. 7](#). Beiträge des qualitativen differentiellen Screenings für die verschiedenen Schritte bei der Suche und der Entwicklung von Pharmazeutika.

[0150] [Fig. 8](#). Isolierung einer differentiell gespleißten Domäne im grb2/grb33-Modell. A) Herstellung synthetischer RNAs von grb2 und grb33. B) Abfolge der ersten Schritte von DATAS, die zur Charakterisierung eines RNA-Fragments führen, das der gespleißten Domäne entspricht: 1: RNA von grb2; 2: Hybridisierung der RNA von grb2 und der cDNA von grb33; 3: Hybridisierung der RNA von grb2 und der cDNA von grb2; 4: Hybridisierung der RNA von grb2 und Wasser; 5: Überstand nach Passieren von Streptavidin-Kügelchen von (2); 6: Überstand nach Passieren von Streptavidin-Kügelchen von (3); 7: Überstand nach Passieren von Streptavidin-Kügelchen von (4); 8: Verdau des grb2-RNA/grb33-cDNA-Duplex mit RNase H; 9: Verdau des grb2-RNA/grb2-cDNA-Duplex mit RNase H; 10: Verdau von grb2-RNA mit RNase H; 11: ähnlich wie (8) nach Passieren einer Ausschluss-Säule; 12: ähnlich wie (9) nach Passieren einer Ausschluss-Säule; 13: ähnlich wie (10) nach Passieren einer Ausschluss-Säule.

[0151] [Fig. 9](#). Darstellung der Populationen von ungepaarten RNAs, die von dem Verdau mit RNase H aus den RNA/einzelsträngiger cDNA-Duplices stammen, von Ethanol-behandelten oder nichtbehandelten HepG2-Zellen stammend.

[0152] [Fig. 10](#). Darstellung der Populationen doppelsträngiger cDNA, die mit einer der DATAS-Varianten generiert sind. 1 bis 12: PCR von Populationen von RNAs-Schleifen, die von dem Verdau mit RNase H stammen; 13: PCR von Gesamt-cDNA.

[0153] [Fig. 11](#). Anwendung der DATAS-Variante, die die doppelsträngige cDNA im grb2/grb33-Modell einsetzt. A) Analyse der Komplexe auf Agarosegel nach Hybridisierung: 1: doppelsträngige grb2-cDNA/grb33-RNA; 2: doppelsträngige grb2-cDNA/grb2-RNA; 3: doppelsträngige grb2-cDNA/Wasser. B) Verdau der Proben 1, 2 und 3 von A) mit der S1-Nuclease und der „Mung Bean“ Nuclease: 1 bis 3: Komplexe 1 bis 3 vor der Glyoxal-Behandlung; 4 bis 6: Komplexe nach der Glyoxal-Behandlung; 7 bis 9: Verdau 1 bis 3 mit S1-Nuclease; 10 bis 12: Verdau 1 bis 3 mit „Mung Bean“ Nuclease.

[0154] [Fig. 12](#). Anwendung der DATAS-Variante, die die einzelsträngige cDNA und die RNase H in einem System mit HepG2-Zellen einsetzt, die 18 Stunden mit 0,1 M Ethanol behandelt oder unbehandelt sind. Die klonierten Inserts sind auf die Membran nach Elektrophorese auf Agarosegel transferiert und einer Hybridisierung mit Hilfe den behandelten (Tr) oder nichtbehandelten Situationen (NT) entsprechenden Sonden unterzogen worden.

[0155] [Fig. 13](#). Vorgehensweise zur Bewertung des toxischen Potenzials eines Produkts.

[0156] [Fig. 14](#). Vorgehensweise zum Verfolgen der Wirksamkeit eines Produkts.

[0157] [Fig. 15](#). Vorgehensweise zur Untersuchung der Empfindlichkeit einer pathologischen Situation auf eine Behandlung.

[0158] [Fig. 16](#). Differentielle Hybridisierungsanalyse von Klonen, die von DATAS aus RNA-Extrakten von induzierten Zellen und von cDNA-Extrakten von nicht induzierten Zellen stammen. A) Verwendung von Bakterienkolonien, die an einer Membran angelagert und lysiert sind. B) Southern Blot, aus einer Selektion von Klonen von A durchgeführt.

[0159] [Fig. 17](#). Nucleotid- und Peptidsequenz von ΔSHC (SEQ ID NR: 9 und 10).

[0160] [Fig. 18](#). Cytotoxizitäts- und Apoptosetests mit HepG2-Zellen, die A) mit Ethanol; B) mit Camptothecin; C) mit PMA behandelt sind.

[0161] [Fig. 19](#). Reaktionen von RT-PCR, die aus RNA-Extrakten von HepG2-Zellen, die nicht behandelt (N.T.) oder mit Ethanol (Eth.), Camptothecin (Camp.) und PMA behandelt sind und die Amplifikation von Fragmenten erlauben, die den Domänen von MACH-a, BCL-X, FASR und beta-Actin als Kontrolle des Grundwerts entsprechen.

[0162] In den Beispielen und der Beschreibung der Erfindung wird Bezug auf die Sequenzen der Se-

quenz-Liste genommen, die den folgenden freien Text enthält:

<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO
<223> OLIGO

BEISPIELE

1. DIFFERENTIELLE KLONIERUNG DER ALTERNATIVEN SPLEISSUNGEN

UND ANDEREN QUALITATIVEN MODIFIKATIONEN DER RNAs UNTER VERWENDUNG VON EINZEL-STRÄNGIGEN cDNAs

[0163] Die Messenger-RNAs, die beiden Situationen entsprechen, einer normalen (mN) und einer anderen pathologischen (mP), werden aus Biopsien oder Zellkulturen isoliert. Diese Messenger-RNAs werden in komplementäre DNA (cN) und (cP) mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) umgeschrieben. mN/cP und cN/mP-Hybride werden dann in flüssiger Phase hergestellt (siehe Schema der [Fig. 2](#), das einen der beiden Fälle veranschaulicht, der zur Bildung von cN/mP führt).

[0164] Diese Hybride sind vorteilhaft in Phenol-Emulsion hergestellt (PERT-Technik oder Phenol Emulsion DNA Reassociation Technique) und mit Thermocyclen erhalten (Miller, R.D. und Riblet, R., 1995, Nucleic Acids Research, Vol. 23, Nr. 12, Seiten 2339-2340). Typischerweise wird dieser Hybridisierungsschritt mit 0,1 bis 1 µg polyA⁺ RNA und 0,1 bis 2 µg komplementärer DNA in einer Emulsion, die aus einer wässrigen Phase (Puffer aus 120 mM Natriumphosphat, 2,5 M NaCl, 10 mM EDTA) und einer organischen Phase gebildet ist, die 8% der wässrigen Phase beinhaltet und aus bidestilliertem Phenol gebildet ist.

[0165] Eine andere Technik ist ebenfalls vorteilhaft eingesetzt, um Heteroduplices zu erhalten: am Ende der reversen Transkription wird die neu synthetisierte cDNA von dem biotinylierten oligo-dT Primer auf einer Ausschluss-Säule getrennt. 0,1 bis 2 µg dieser cDNA wird mit 0,1 bis 1 µg polyA⁺ RNA in Gegenwart von 0,3 M Natriumacetat und zwei Volumina Ethanol mitgefällt. Diese mitgefällten Nucleinsäuren werden in 30 µl Hybridisierungspuffer wieder aufgenommen, der 80% Formamid, 40 mM PIPES (Piperazin-bis(2-ethansulfonsäure) pH 6,4, 0,4 M NaCl und 1 mM EDTA enthält.

[0166] Die Nucleinsäuren in Lösung werden durch Erhitzen auf 85°C 10 min denaturiert, dann wird ihre Hybridisierung in wenigstens 16 h und bis 48 h bei 40°C durchgeführt.

[0167] Der Vorteil der Hybridisierungstechnik in Formamid ist, dass diese stärkere selektive Bedingungen während der Paarung der cDNA- und RNA-Stränge erlaubt.

[0168] Am Ende dieser beiden Hybridisierungstechniken verfügen wir über RNA/DNA-Heteroduplex, dessen perfekte Paarung von der Effizienz der RT abhängt, die gesamte Länge der cDNA zu synthetisieren. Es verbleiben ebenfalls die RNA-Regionen in einzelsträngiger Form (und DNA), die alternativen Spleißungen entsprechen, die die beiden untersuchten physiopathologischen Zustände unterscheiden.

[0169] Das Ziel des Verfahrens ist dann, die genetische Information zu charakterisieren, die die Spleiß-Schleifen enthalten.

[0170] Hierfür werden die Heteroduplices durch Einfangen der cDNA (mit biotinylierten oligo-dT Primern versehen) mit Hilfe von Kügelchen, die Streptavidin-Gruppen tragen, gereinigt. Vorteilhafterweise sind diese Kügelchen magnetisch, was erlaubt, sie mit Hilfe eines Magnetseparators von RNAs zu trennen, die nicht an den Heteroduplices beteiligt sind. Derartige Kügelchen und Separatoren sind im Handel erhältlich.

[0171] In diesem Stadium des Verfahrens sind die Heteroduplices und die an diesen Hybridisierungen mit den RNAs nicht beteiligten cDNAs getrennt. Dieses Material wird dann einer RNase H-Behandlung unterzogen, die spezifisch die mit den cDNAs hybridisierten RNA-Regionen hydrolysiert. Die aus dieser Hydrolyse resultierenden Produkte sind einerseits die cDNAs und andererseits die RNA-Fragmente, die den Spleiß-Schleifen oder, wegen der partiellen Wirkung der inversen Transkriptase, nicht hybridisierten Regionen entsprechen. Die RNA-Fragmente werden von der cDNA durch magnetische Trennung gemäß derselben weiter oben erwähnten Arbeitsweise und durch Verdau mit der DNase getrennt, die von jeglicher Kontamination mit einer RNase-Aktivität befreit ist.

1.1. Validierung der DATAS-Technologie bei Spleißvarianten des Grb2-Gens

[0172] Eine Darstellung der Durchführbarkeit dieses Versuchsansatzes ist mit einem in vitro System unter Verwendung einer RNA durchgeführt worden, die einerseits der Grb2 codierenden Region entspricht, und einer einzelsträngigen cDNA entspricht, die zu einer Grb3.3 codierenden Region komplementär ist. Grb2 ist ein Gen, das 651 codierende Basenpaare besitzt. Grb33 ist eine Isoform von Grb2, die durch alternatives Spleißen generiert ist und eine Deletion von 121 Basenpaaren in der funktionellen SH2-Domäne von Grb2 umfasst (Fath et al., Science (1994), 264, 971-4). Die RNAs von Grb2 und Grb33 werden gemäß dem Fachmann bekannten Techniken aus einem Plasmid, das die von Grb2 oder Grb33 codierende Sequenz unter Kontrolle des T7-Promotors enthält, mit Hilfe des RiboMax Kit (Promega) synthetisiert. Die Analyse der Produkte zeigt eine homogene Synthese (**Fig. 8A**). Zur Visualisierung wurde ebenfalls Grb2 mittels Einbau einer markierten Base während der in vitro Transkription mit Hilfe des RiboProbe Kits (Promega) radioaktiv gemacht. Die cDNAs von Grb2 und Grb3.3 sind mittels inverser Transkription aus oben hergestellten synthetischen RNAs des Kit Superscript II (Life Technologies) und dem für Grb2 und Grb3.3 gemeinsamen biotinylierten Oligonucleotid-Primer, der der Komplementärsequenz (618-639) von Grb2 entspricht, synthetisiert worden. Die RNAs und cDNAs sind gemäß Herstellerangaben (Promega, Life Technologies) behandelt, auf einer Ausschluss-Säule (RNase-freie Sephadex G25 oder G50, 5 Prime, 3 Prime) gereinigt und mittels Spektrophotometrie quantifiziert worden.

[0173] Angewandt worden sind die ersten Schritte von DATAS in Suspension von 10 ng markierter RNA von Grb2, zusammen mit:

1. 100 ng cDNA von biotinyliertem Grb33,
2. 100 ng cDNA von biotinyliertem Grb2,
3. Wasser

in 30 µl Nybridisierungspuffer, der 80% Formamid, 40 mM PIPES (pH 6,4), 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA enthält. Die Nucleinsäuren werden durch 10 min Erhitzen auf 85°C denaturiert, dann wird die Hybridisierung 16 Stunden bei 40°C durchgeführt. Nach Einfangen mit Hilfe der Streptavidin-Kügelchen werden die Proben mit der RNase H, wie bereits beschrieben, behandelt.

[0174] Die Analyse dieser Schritte erfolgt mittels Elektrophorese auf Acrylamidgel mit Hilfe eines Instant Imagers (Packard Instruments), der die Charakterisierung und Quantifizierung der von der markierten Grb2-RNA stammenden Spezies erlaubt (**Fig. 8B**). Daher zeigen die Spuren 2, 3 und 4, dass die grb2/grb33 und grb2/grb2-Duplices sich quantitativ gebildet haben. Die Migration des grb2/grb33-Komplexes ist verglichen mit dem der grb2-RNA (Spur 2) verzögert, während die Migration des grb2/grb2-Komplexes erhöht ist (Spur 3). Die Spuren 5, 6 und 7 entsprechen den Proben, die von den Streptavidin-Kügelchen nicht zurückgehalten werden, was zeigt, dass 80% der grb2/grb33 und grb2/grb2-Komplexe von den Kügelchen zurückgehalten werden, während die RNA von nur grb2, die nicht biotinyliert ist, sich ausschließlich im Überstand der Kügelchen wiederfindet. Die Behandlung mit RNase H setzt, außer den freien Nucleotiden, die schneller als Bromphenol-Blau (BPB) migrieren, eine Spezies frei, die diesseits von Xylen-Cyanol-Blau (XC) (mit Pfeil in der Figur markiert) migriert und dies spezifisch in Spur 8, die dem grb2/grb33-Komplex entspricht, verglichen mit den Spuren 9 und 10, die den grb2/grb2-Komplexen und der grb2-RNA entsprechen. Die Spuren 11, 12 und 13 entsprechen den Spuren 8, 9 und 10, nachdem die Proben eine Ausschluss-Säule passiert haben, um die freien Nucleotide zu eliminieren. Die beobachtete Migration in den Spuren 8 und 11 entspricht derjenigen, die für ein RNA-Molekül erwartet wird, das einer Deletion von 121 Nucleotiden entspricht, die grb2 von grb33 unterscheidet.

[0175] Dieses Ergebnis zeigt gut, dass es möglich ist, Schleifen von RNA zu erhalten, die mit der Heteroduplex-Bildung von zwei Sequenzen generiert werden, die von zwei Spleißisoformen abstammen.

1.2. Anwendung der DATAS-Technik zur Generierung von qualitativen Banken von Hepatocyten in gesundem und toxischem Zustand.

[0176] Es wurde eine komplexere Situation untersucht. Im Rahmen der Anwendung der DATAS-Technologie als ein Vorhersage-Instrument der Toxizität von Molekülen wurden die humanen Hep2G-Hepatocyten 18 Stunden mit 0,1 M Ethanol behandelt. Die RNAs sind aus behandelten oder nichtbehandelten Zellen extrahiert worden. Die oben beschriebene DATAS-Variante (Präparation biotinylierter einzelsträngiger cDNA, Kreuzhybridisierungen in flüssiger Phase, Anwendung eines Magnetfeldes zur Trennung der Spezies, Behandlung mit RNase H) ist mit nicht behandelten Zellen in einer Referenzsituation (oder Situation A) und den behandelten Zellen in Testsituation (oder Situation B) angewandt worden ([Fig. 9](#)). Die RNA-Extrakte sind nichtradioaktiv markiert worden und die Visualisierung der mittels RNase H-Verdau generierten RNA-Population erfolgt durch eine Austauschreaktion des 5'-Phosphates der RNAs durch ein markiertes Phosphat mit Hilfe der T4-Polynucleotid-Kinase und gamma ³²P ATP. Diese Markierungen werden dann auf einem Harnstoff/Acrylamidgel aufgetragen und mittels Exposition mit Hilfe eines Instant Imager (Packard Instruments) analysiert. Die von A/B und B/A-Hybridisierungen stammenden komplexen Signaturen können nun mit einer ersten Gruppe von Signalen, die schlecht im Gel migrieren und den Nucleinsäure-Sequenzen entsprechen, die eine beträchtliche Größe besitzen, und mit einer zweiten Gruppe von Signalen sichtbar gemacht werden, die zwischen 25 und 500 Nucleotiden migrieren. Diese Signaturen aus der Situation A/A haben eine viel geringere Intensität, was vermuten lässt, dass das Ethanol eine Reprogrammierung von Spleißungen der RNAs induzieren kann, die von dem Vorhandensein von Signalen in A/B und B/A wiedergegeben werden.

1.3. Klonierung und Präparation von Banken aus identifizierten Nucleinsäuren

[0177] Mehrere experimentelle Varianten sind ferner denkbar, um diese RNase H resistenten RNA-Fragmente zu klonieren:

A. Ein erster Versuchsansatz besteht aus der Isolierung und Klonierung dieser Schleifen ([Fig. 3](#)).

[0178] Gemäß diesem Versuchsansatz wird eine Ligation von Oligonucleotiden an jedem Ende mit Hilfe der RNA-Ligase unter dem Fachmann bekannten Bedingungen durchgeführt. Diese Oligonucleotide werden dann als Primer verwendet, um eine RT PCR durchzuführen. Die PCR-Produkte werden kloniert und mit vollständig komplementären Sonden, die den beiden Situationen von Interesse entsprechen, durchmustert. Nur die Klone, die bevorzugt mit nur einer der beiden Sonden hybridisieren, enthalten die Spleiß-Schleifen, die dann sequenziert und/oder zur Generierung der Banken verwendet werden.

[0179] B. Der zweite Versuchsansatz ([Fig. 4](#)) besteht aus einer Durchführung der mit Hilfe wenigstens zum Teil zufälliger Primer initiierten inversen Transkription der einzelsträngigen RNA, die aus Heteroduplexen nach Behandlung mit RNase H freigesetzt ist. Es kann sich daher um in 3' und 5' Zufallsprimer, um in 3' zufällige und 5' definierte Primer oder auch um halbzufällige Primer handeln, die nämlich einen degenerierten Bereich und einen definierten Bereich umfassen.

[0180] Gemäß dieser Strategie sind die Primer in der Lage, entweder irgendwo an der einzelsträngigen RNA oder an jeder mit der Wahl des halbzufälligen Primers festgelegten Basenfolge zu hybridisieren. Eine PCR mit Primern, die oben beschriebenen Oligonucleotiden entsprechen, erlaubt dann, von den Spleiß-Schleifen abstammende Sequenzen zu erhalten.

[0181] Die [Fig. 10](#) (Spur 1 bis 12) zeigt die Analyse auf einem Acrylamidgel der PCR-Fragmente, die aus mehreren DATAS-Versuchen erhalten sind und für die Verwendung mit folgenden halbzufälligen Primern gekoppelt sind:

GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGT (SEQ ID NR: 1, X=T)
 GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGA (SEQ ID NR: 1, X=A)
 GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGC (SEQ ID NR: 1, X=C)
 GAGAAGCGTTATNNNNNNNAGGG (SEQ ID NR: 1, X=G)

[0182] Der Vergleich mit der Komplexität der Signaturen, die unter Verwendung derselben Oligonucleotide aber der Gesamt-cDNA als Matrize (Spur 13) erhalten sind, zeigt, dass DATAS erlaubt hat, die den qualitativen Unterschieden entsprechenden Informationen zu filtern („profilieren“).

[0183] Diese Variante ist verwendet worden, um ein Ereignis zu klonieren, das der RNA-Domäne von grb2 entspricht, die durch Behandlung mit RNase H aus dem Duplex grb2-RNA/einzelsträngige cDNA von grb33 gemäß dem bereits beschriebenen Protokoll (Beispiel 1.1) generiert ist. Zu diesem Zweck ist ein Oligonucleotid

mit der Sequenz: GAGAAGCGTTATNNNNNNNTCCC (SEQ ID NR: 2) verwendet worden, das aus dem Modell GAGAAGCGTTATNNNNNNNWXYZ (in dem N wie vorhergehend definiert ist, W, X und Y für jede feststehend bestimmte Base stehen und Z entweder für eine bestimmte Base oder eine 3' OH-Gruppe steht, SEQ ID NR: 3) ausgewählt und selektiert ist, um ein Fragment in der Deletion von grb2 zu amplifizieren, was die Generierung eines PCR-Fragments erlaubt, dessen Klonierung und Sequenzierung gezeigt hat, dass es tatsächlich von der von grb2 deletierten Domäne abstammt.

[0184] Die beiden Versuchsansätze erlauben folglich die Herstellung von Zusammensetzungen von Nucleinsäuren, die für differentielle Spleißungen in den beiden getesteten Situationen repräsentativ sind, die als Sonden oder zur Konstruktion von cDNA-Banken von qualitativen Unterschieden eingesetzt sein können. Die Tauglichkeit der DATAS Technologie zur Generierung der profilierten Banken von cDNA, die für qualitative Unterschiede repräsentativ sind, wird ebenfalls mit nachfolgenden Beispiel 1.4. veranschaulicht.

1.4. Herstellung von profilierten Banken, die für humane Endothelzellen repräsentativ sind

[0185] Dieses Beispiel ist mit einer humanen Endothelzelllinie (ECV304) durchgeführt worden. Die qualitative Analyse der Genexpression ist mit cytosolischen RNA-Extrakten einerseits von proliferierenden Zellen und andererseits von Zellen in Anoikis (Apoptose durch Entfernen des Anhaftungsträgers) durchgeführt worden.

[0186] Die ECV-Zellen sind in 199 Medium, supplementiert mit Earle Salzen (Life Sciences), kultiviert worden. Durch 4 stündige Passage in polyHEMA behandelten Kulturschalen werden die Zellen in den Anoikiszustand gebracht. Bei der RNA-Präparation sind die Zellen in einem Nonidet P-40 haltigen Puffer lysiert worden. Die Kerne sind dann durch Zentrifugation entfernt worden. Die Lösung des cytoplasmatischen Extrakts ist dann so eingestellt worden, um auf spezifische Weise die RNA auf der Rneasy Siliciumdioxid-Matrize gemäß der Qiagen Herstelleranleitung zu fixieren. Nach Waschen werden die Gesamt-RNAs in Wasser eluiert, das DEPC-behandelt ist. Die Messenger-RNA wird aus der Gesamt-RNA durch Trennung auf magnetischen Dynabeads oligo (dT)₂₅ Kügelchen (Dyna) präpariert. Nachdem die Kügelchen in Fixierungspuffer suspendiert sind, wird die Gesamt-RNA 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach magnetischer Trennung und Waschen werden die Kügelchen in einem Elutionspuffer für eine Inkubation bei 65°C wieder aufgenommen, die die Messenger-RNAs freisetzt.

[0187] Die Synthesen des ersten DNA-Stranges sind mit Messenger-RNAs unter Verwendung der Reversen Transkriptase SuperScript II oder ThermoScript (Life Technologies) mit Hilfe von oligo (dT) Primern durchgeführt. Nach RNase H-Behandlung werden die freien Nucleotide durch Passieren einer Sephadex G50 Säule (5 Prime- 3 Prime) eliminiert. Nach Extraktion in Phenol/Chloroform und Fällung in Ethanol werden die Proben mittels UV-Absorption quantitativ bestimmt.

[0188] Die erforderlichen RNA und cDNA-Mengen (in diesem Fall jeweils 200 ng) werden vereint und in Ethanol gefällt. Die Proben werden in einem 30 µl Volumen Hybridisierungspuffer (40 mM Hepes (pH 7,2), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA), supplementiert mit deionisiertem Formamid (80% (v/v) außer anderes ist angegeben) wieder aufgenommen. Nach 5 min Denaturierung bei 70°C werden die Proben über Nacht bei 40°C inkubiert.

[0189] Die Streptavidin-Kügelchen (Dyna) werden gewaschen, dann in Fixierungspuffer (2X = 10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 2 M NaCl, 1 mM EDTA) rekonditioniert. Die Hybridisierungsproben werden auf ein 200 µl Volumen mit Wasser aufgefüllt, dann werden 200 µl Kügelchen für eine 60 min Inkubation bei 30°C zugegeben. Nach Einfangen auf einem Magneten und Waschen der Kügelchen, werden diese in 150 µl RNase H Puffer wieder aufgenommen, dann 20 min bei 37°C inkubiert. Nach Einfangen auf einem Magneten sind die nichthybridisierten Regionen in den Überstand freigesetzt, der mit Dnase behandelt ist, dann mit Phenol/Chloroform extrahiert, dann in Ethanol gefällt worden. Die Ethanol-Fällungen der geringen Mengen an Nucleinsäuren werden mit Hilfe eines im Handel erhältlichen Enzyms, SeeDNA (Amersham Pharmacia Biotech), durchgeführt, das die quantitative Wiedergewinnung der Nucleinsäuren aus sehr verdünnten Lösungen (Größenordnung ng/ml) erlaubt.

[0190] Die cDNA-Synthese aus Proben von RNAs, die aus der RNase H-Behandlung hervorgehen, wird mit zufälligen Hexanucleotiden mit Hilfe von Superscript II Reverse Transcriptase durchgeführt. Die RNA wird dann mit Hilfe einer Mischung aus RNase H und RNase T1 abgebaut. Der Primer, die nicht eingebauten Nucleotide und die Enzyme werden von der cDNA mit Hilfe einer „GlassMAX Spin“ Kartusche abgetrennt. Die den Spleiß-Schleifen entsprechende cDNA wird dann einer PCR-Reaktion unter Verwendung von halbzufälligen Oligonucleotiden, die bereits weiter oben in der Erfindung beschrieben sind, unterzogen. In diesem Fall sind die gewählten Oligonucleotide:

GAGAAGCGTTATNNNNNCCA (SEQ ID NR: 4)

[0191] Die PCR-Reaktion wird mit Hilfe der Taq Polymerase über 30 Cyclen durchgeführt:

- Initiale Denaturierung: 94°C für 1 min
- 94°C für 30 s
- 55°C für 30 s
- 72°C für 30 s
- Finale Extension 72°C für 5 min

[0192] Die PCR-Produkte sind in den pGEM-T Vektor (Promega) kloniert worden, der ein an den 3'-Enden hängendes T besitzt, um die Klonierung von der Behandlung mit Taq-Polymerase stammenden Fragmenten zu erleichtern. Nach Transformation in die kompetenten JM109 Bakterien (Promega) werden die erhaltenen Kolonien auf Nitrocellulose-Filter übertragen und mit Sonden hybridisiert, die von PCR-Produkten stammen, die einerseits mit Gesamt-cDNA von proliferierenden Zellen und andererseits mit Zellen in Anoikis durchgeführt wurden. Für diese PCR werden dieselben GAGAAGCGTTATNNNNNCCA Oligonucleotide verwendet. In einer ersten Versuchsdurchführung sind 34 Klone, die bevorzugt mit der Sonde der Zellen in Apoptose hybridisieren, und 13 Klone, die bevorzugt mit der Sonde von proliferierenden Zellen hybridisieren, isoliert worden.

[0193] Unter diesen 13 Klonen enthalten 3 Klone dasselbe cDNA-Fragment, das von der SH2-Domäne des SHC-Proteins stammt.

[0194] Die Sequenz dieses Fragments ist die folgende:

CCACACCTGGCCAGTATGTGCTCACTGGCTTGCCAGAGTGGGCAGCCAGCC TAAGCATTTCGACTGG
(SEQ ID NR: 5)

[0195] Die Verwendung von PCR-Primern, die die SH2-Domäne von SHC flankieren (oligo5': GG-GACCTGTTTGACATGAAGCCC (SEQ ID NR: 6); oligo3': CAGTTTCCGCTCCACAGGTTGC (SEQ ID NR: 7)), hat ermöglicht, die Deletion der SH2-Domäne von SHC zu charakterisieren, die spezifisch in den ECV-Zellen in Anoikis beobachtet ist. Mit diesem Primer-Paar wird ein einziges Amplifikationsprodukt, das einem cDNA-Fragment mit 382 Basenpaaren entspricht, das die vollständige SH2-Domäne enthält, aus RNA von ECV-Zellen in exponentieller Phase erhalten. Ein zusätzliches Fragment mit 287 Basenpaaren wird beobachtet, wenn die PCR aus RNA von Zellen in Anoikis durchgeführt wird. Dieses weitere Fragment stammt von einer Messenger-RNA, die von Messenger-RNA von SHC stammt, aber eine Deletion aufweist.

[0196] Die Sequenz dieser Deletion ist die folgende:

GTACGGGAGAGCACGACCACACCTGGCCAGTATGTGCTCACTGGCTTGCA GAGTGGGCAGCCTAAG-
CATTGCTACTGGTGGACCCTGAGGGTGTG (SEQ ID NR: 8).

[0197] Diese Deletion entspricht den Basen 1198 bis 1293 des offenen Rahmens des Messengers, der für die Formen 52 kDa und 46 kDa des SHC-Proteins codiert (Pelicci, G. et al., 1992, Cell, Seiten 93-104).

[0198] Die Strukturdaten der SH2-Domänen wie auch die Literatur weisen darauf hin, dass eine derartige Deletion zu einem Verlust der Affinität für die Phosphotyrosine führt, da sie die Aminosäuren umfasst, die an den Wechselwirkungen mit den phosphorylierten Tyrosinen beteiligt sind (Waksman, G. et al., 1992, Nature, vol. 358, Seiten 646-653). Wobei die SHC-Proteine Adapter sind, die verschiedene Partner über ihre SH2 und PTB (Phosphotyrosin-bindende Domäne)-Domänen verbinden, generiert diese Deletion folglich eine natürliche negative Dominanz von SHC, die wir als Δ SHC bezeichnen. Da die SH2-Domänen der Proteine, deren Gene sequenziert sind, von zwei Exons getragen sind, ist es wahrscheinlich, dass die mit dem DATAS-Verfahren identifizierte Deletion einem alternativen Exon des SHC-Gens entspricht.

[0199] Die Protein- und Nucleinsequenzen von Δ SHC sind in den **Fig. 17** dargestellt (SEQ ID NR: 9 und 10).

[0200] Da die SH2 und SHC-Domäne an der Transduktion zahlreicher Signale beteiligt sind, die an der Zellproliferation und Zellviabilität beteiligt sind, erlaubt die Untersuchung der Δ SHC-Sequenz ihre Eigenschaften der negativen Dominanz über das SHC-Protein und ihrer Fähigkeit, mit verschiedenen zellulären Signalen zu interferieren, vorherzusagen.

[0201] Die Erfindung betrifft ebenfalls diese neue gespleißte Form von SHC, die der Spleißung entsprechenden Proteindomäne, jeden Antikörper oder jede Nucleinsonde, die ihre Detektion in einer biologischen Probe erlaubt, und ihre beispielsweise diagnostische oder therapeutische Verwendung.

[0202] Die Erfindung betrifft insbesondere jede Variante von SHC, umfassend wenigstens eine Deletion, die den Basen 1198 bis 1293 entspricht, ganz besonders eine Deletion der Sequenz SEQ ID NR: 8. Die Erfindung betrifft spezifischer die Δ SHC-Variante, die die Sequenz SEQ ID NR: 9 besitzt, die von der SEQ ID NR: 10 codiert ist.

[0203] Die Erfindung betrifft ebenfalls jede Nucleinsonde, jedes Oligonucleotid oder jeden Antikörper, die die Identifizierung der oberen Δ SHC-Variante und/oder jede Änderung des SHC/ Δ SHC Verhältnisses in einer biologischen Probe erlauben. Es kann sich besonders um eine Sonde oder Oligonucleotid, die zu der ganzen oder einem Teil der Sequenz SEQ ID NR: 8 komplementär ist, oder um einen Antikörper handeln, der gegen die von dieser Sequenz codierten Proteindomäne gerichtet ist. Derartige Sonden, Oligonucleotide oder Antikörper erlauben das Vorliegen der nicht gespleißten Form (z.B. SHC) in einer biologischen Probe zu detektieren.

[0204] Die Materialien können außerdem mit Sonden, Oligonucleotiden und/oder Antikörpern parallel verwendet sein, die für Spleißformen (z.B. Δ SHC) spezifisch sind, nämlich zum Beispiel der Verknüpfungsregion entsprechen, die aus einer Spleißung resultiert (befindet sich in der Nähe des Nucleotids 1198 der Sequenz SEQ ID NR: 10).

[0205] Derartige Materialien können für die Diagnose von Krankheiten verwendet sein, die mit einer Immun-depression (Krebs, Behandlung mit Immunsuppressoren, AIDS, etc.) verbunden sind.

[0206] Die Erfindung betrifft auch jedes Verfahren für das Screening von Molekülen, die auf der Blockierung (i) der gespleißten Domäne in dem SHC-Protein (besonders zur Induktion eines immuntoleranten Zustands zum Beispiel bei Autoimmunkrankheiten oder Abstoßung von Transplantaten oder Krebs) oder (ii) der Funktionsgewinne, die vom Δ SHC-Protein erworben sind, beruhen.

[0207] Die Erfindung betrifft außerdem die therapeutische Verwendung von Δ SHC und insbesondere zur Behandlung von Krebszellen oder Krebs (ex vivo oder in vivo), in denen eine Hyperphosphorylierung des Δ SHC-Proteins gezeigt werden kann. In dieser Hinsicht betrifft die Erfindung auch jeden Vektor, insbesondere viralen Vektor, der eine für Δ SHC codierende Sequenz umfasst. Es handelt sich bevorzugt um einen Vektor, der in der Lage ist, Krebszellen oder proliferierende Zellen zu transfizieren, wie glatte Muskelzellen, Endothelzellen (Restenose), Fibroblasten (Fibrosen) vorzugsweise Säugerursprungs, insbesondere humanen Ursprungs. Als viralen Vektor kann man besonders die Adenovirusvektoren, retroviralen Vektoren, AAV-Vektoren, Herpes-Vektoren etc. nennen.

2. DIFFERENTIELLE KLONIERUNG DER ALTERNATIVEN SPLEISSUNGEN UND ANDEREN QUALITATIVEN MODIFIKATIONEN DER RNAs UNTER VERWENDUNG DER DOPPELSTRÄNGIGEN cDNAs ([Fig. 5](#)).

[0208] Die den normalen (mN) und pathologischen (mP) Situationen entsprechenden Messenger-RNAs werden wie die komplementären doppelsträngigen DNAs (dsN und dsP) nach klassischen molekularbiologischen Protokollen hergestellt. Strukturen vom Typ „R-Schleife“ werden nun durch Hybridisierung von mN mit dsP und mP mit dsN in einer 70% Formamid-haltigen Lösung erhalten. Die zwischen der Situation N und P differentiell gespleißten Nucleinsäure-Domänen werden in Form von doppelsträngiger DNA bleiben. Die verdrängten einzelsträngigen cDNAs werden nun mit Glyoxal behandelt, um die Wiederanlagerung des RNA-Stranges während der Entfernung von Formamid zu vermeiden. Nach der Entfernung von Formamid und Glyoxal, sowie anschließender Behandlung mit RNase H finden wir Bienen-ähnliche Strukturen vor, wobei die ungepaarten einzelsträngigen DNAs die Flügel der Biene darstellen und die gepaarte doppelsträngige Domäne von Interesse den Bienenkörper darstellt. Die Verwendung von Enzymen, die die einzelsträngige DNA wie die S1 Nuclease oder die Mung Bean Nuclease spezifisch abbauen, erlaubt die Isolierung von zurückbleibender doppelsträngiger DNA, die anschließend kloniert und dann sequenziert wird. Diese zweite Technik erlaubt die direkte Gewinnung eines Abdrucks von doppelsträngiger DNA der Domäne von Interesse im Vergleich zum ersten Protokoll, das einen RNA-Abdruck dieser Domäne liefert.

[0209] Dieser Versuchsansatz ist mit einem zuvor beschriebenen grb2/grb33 Modell durchgeführt worden. Die doppelsträngige DNA von grb2 ist mittels PCR-Amplifikation aus der einzelsträngigen cDNA von grb2 und zwei Nucleotid-Primern, die der Sequenz (1-22) von grb2 und der komplementären Sequenz (618-639) von grb2 entsprechen, hergestellt worden. Dieses PCR-Fragment ist auf einem Agarosegel und auf einer Affinitäts-säule (JetQuick, Genomed) gereinigt und mittels spektrophotometrisch quantifiziert worden. Zur selben Zeit sind zwei synthetische RNAs, die den Leserahmen von grb2 und grb33 entsprechen, aus Plasmid-Vektoren, die die cDNAs von grb2 und grb33 unter Kontrolle des T7-Promotors tragen, mit Hilfe des RiboMax Kit (Promega) hergestellt worden. Die RNAs sind nach Herstelleranleitung gereinigt und auf einer Ausschluss-Säule

(Sephadex G50, 5 prime-3 prime) gereinigt worden. 600 ng doppelsträngige DNA von grb2 (1-639) sind assoziiert mit:

1. 3 µg RNA von grb33
2. 3 µg RNA von grb2
3. Wasser

in drei verschiedenen Reaktionen in folgendem Puffer: 100 mM PIPES (pH 7,2), 35 mM NaCl, 10 mM EDRA, 70% deionisiertes Formamid (Sigma).

[0210] Die Proben werden auf 56°C erwärmt, dann auf 44°C in -0,2°C Stufen alle 10 Minuten heruntergekühlt. Dann werden sie bei 4°C konserviert. Die Analyse auf Agarosegel zeigt Migrationsänderungen in den Spuren 1 und 2 im Vergleich zur Kontrollspur 3 (**Fig. 11A**), was die Bildung neuer Komplexe andeutet. Die Proben werden dann mit deionisiertem Glyoxal (Sigma) (5% v/v oder 1 M) 2 h lang bei 12°C behandelt. Die Komplexe werden dann in 70% Ethanol gefällt, dann in Wasser wieder aufgenommen. Sie werden schließlich mit RNase H (Life Technologies) behandelt, dann mit einem Enzym behandelt, das spezifisch die einzelsträngige DNA abbauen kann. Die S1-Nuclease und die "Mung bean" Nuclease weisen diese Eigenschaft auf und sind im Handel erhältlich (Life Technologies, Amersham). Derartige Verdauungen (5 Minuten Inkubation in Puffer vom Hersteller mit diesen Enzymen) sind auf Agarosegel analysiert worden (**Fig. 11B**). Signifikante Verdauungen sind nur von den Komplexen erhalten worden, die von der Reaktion 1 (grb2/grb33) stammen (**Fig. 11B**, Spuren 7 und 10). Diese Verdauungen scheinen mit der S1-Nuclease (Spur 7) vollständiger zu sein als mit der „Mung bean“ Nuclease (Spur 10). Daher ist die Bande, die einer Größe von etwas mehr als 100 Basenpaaren entspricht (Pfeil in Spur 7 zeigt darauf) gereinigt, in den pMos-Blue Vektor (Amersham) kloniert, dann sequenziert worden. Dieses Fragment entspricht der Domäne mit 120 Basenpaaren von grb2, das in grb33 deletiert ist.

[0211] Dieser Versuchsansatz kann nun mit einer Messenger-RNA-Gesamtpopulation und einer doppelsträngigen cDNA-Gesamtpopulation gemäß dem Fachmann bekannten Techniken durchgeführt werden. Die RNA-Population der Referenzsituation wird an die doppelsträngige cDNA-Population der Testsituation und umgekehrt hybridisiert. Nach Anwendung des oben beschriebenen Protokolls werden die Verdauungen auf ein Agarosegel aufgetragen, um die Banden zu isolieren und zu reinigen, deren Größe zwischen 50 und 300 Basenpaaren entspricht. Diese Banden werden dann in einen Vektor (pMos-Blue Vektor, Amersham) kloniert, um eine Bank von Inserts zu schaffen, die mit Ereignissen von qualitativen Unterschieden angereichert ist.

3. KONSTRUKTION VON BANKEN, DIE VON QUALITATIVEN DIFFERENTIELLEN SCREENINGS ABSTAMMEN

[0212] Die beiden oben beschriebenen Beispiele führen zu Klonierungen von cDNAs, die für die ganze oder einen Teil der Sequenzen repräsentativ sind, die zwischen zwei bestimmten physiopathologischen Situationen differentiell gespleißt sind. Diese cDNAs erlauben die Bildung von Banken durch Insertion dieser cDNAs in Plasmid- oder Phagenvektoren. Diese Banken können auf Nitrocellulose-Filtern oder jedem anderen Träger, der dem Fachmann bekannt ist, wie Chips oder Biochips oder Membranen präsentiert sein. Diese Banken können in der Kälte lichtgeschützt konserviert sein. Diese Banken, wenn sie einmal auf einem Träger mit Hilfe klassischer Techniken angelagert und fixiert sind, können mit Verbindungen behandelt werden, um die Wirtsbakterien zu eliminieren, die die Produktion der Plasmide oder Phagen erlauben. Diese Banken können ebenfalls vorteilhaft aus cDNA-Fragmenten gebildet sein, die den klonierten cDNAs entsprechen, aber so mit PCR hergestellt sind, dass nur die Sequenzen auf dem Filter anlagern, die von alternativen Spleißereignissen stammen.

[0213] Ein Merkmal und gleichzeitig das Neue des qualitativen differentiellen Screenings ist, dass diese Technik vorteilhafterweise nicht nur zu einer sondern zu zwei differentiellen Banken („Banken-Paar“) führt, die die Gesamtheit der qualitativen Unterschiede repräsentieren, die zwischen zwei bestimmten Situationen vorliegen. Insbesondere repräsentiert eine der Banken die Signatur der Merkmale der physiologischen Testsituation im Vergleich zur physiologischen Referenzsituation, und die andere Bank repräsentiert die Signatur der Merkmale der physiologischen Referenzsituation im Vergleich zur physiologischen Testsituation. Dieses Banken-Paar wird ebenfalls als Paar von Banken oder „differentielle Bank von Spleißungen“, bezeichnet.

[0214] Da einer der Beiträge des qualitativen differentiellen Screenings ist, die Bewertung des toxischen Potenzials einer Verbindung zu erlauben, wie es im folgenden Kapitel angeführt ist, ist ein gutes Beispiel für die Anwendung der Technologie die Gewinnung von cDNA-Klonen mit Hilfe von DATAS, die Sequenzen entsprechen, die einerseits für naive HepG2-Zellen und andererseits für Ethanolbehandelte Zellen spezifisch sind. Diese Zellen zeigen Anzeichen einer Cytotoxizität und eines Abbaus ihrer DNA durch intranukleosomale Frag-

mentierung ab 18 h in Gegenwart von 1 M Ethanol. Um frühe Marker der Ethanol-Toxizität zu erhalten, werden die Messenger-RNAs aus naiven Zellen und 18 h mit 0,1 M konzentriertem Ethanol behandelten Zellen präpariert. Nach Durchführung der DATAS-Variante, die die einzelsträngige cDNA und die RNase H verwendet, sind entsprechend dem Fachmann bekannten Techniken die erhaltenen klonierten cDNAs mit PCR amplifiziert, einer Elektrophorese auf Agarosegel unterzogen und dann auf einen Nylon-Filter transferiert worden. Jede Gesamtheit von Klonen, die einerseits für qualitativen Unterschiede, die für den nativen Zustand spezifisch sind, und andererseits für Sequenzen spezifisch sind, die für Ethanol-behandelte Zellen spezifisch sind, werden zwei identische Repliken auf Filtern durchgeführt. Daher werden die Abdrücke von jeder Gesamtheit von Klonen einerseits mit einer Sonde, die für nicht behandelte Zellen spezifisch ist, und andererseits mit einer Sonde hybridisiert, die für mit 0,1 M Ethanol 18 h behandelte Zellen spezifisch ist.

[0215] Das erhaltene und in [Fig. 12](#) gezeigte differentielle Hybridisierungsmuster erlaubt die Qualität der durchgeführten Subtraktion bei der Durchführung der DATAS-Technik zu bewerten. Daher hybridisieren die Klone, die von der Hybridisierung von der mRNA von nicht behandelten Zellen (NT) mit cDNA von behandelten Zellen (Tr) stammen und die qualitativen Unterschieden entsprechen müssen, die für die naive Situation spezifisch sind, bevorzugt mit einer Sonde, die die Gesamtpopulation der Messenger-RNAs der nicht behandelten Zellen repräsentiert. Umgekehrt hybridisieren die Klone, die von Produkten, die einer Behandlung mit RNase H widerstehen, mit der die (Tr)RNA/(NT)DNA-Heteroduplexe behandelt wurden, bevorzugt mit einer Sonde, die von der Gesamtpopulation der Messenger-RNAs der behandelten Zellen abstammt.

[0216] Die beiden Gruppen von Klonen, die einerseits für die behandelte Situation und andererseits für die nicht behandelte Situation spezifisch sind, repräsentieren zum Beispiel eine Bank von qualitativen Unterschieden, die für beide verschiedene zelluläre Zustände charakteristisch sind.

4. VERWENDUNGEN UND BEITRÄGE DER QUALITATIVEN DIFFERENTIELLEN BANKEN.

[0217] Die Einsatzmöglichkeiten der Banken von differentiellen Spleißungen sind insbesondere in den [Fig. 13](#) bis [Fig. 15](#) veranschaulicht. Daher können die Banken verwendet sein für:

4.1. Die Bewertung des toxischen Potenzials einer Verbindung ([Fig. 13](#)):

[0218] In diesem Beispiel wird die Referenzsituation als A bezeichnet und die toxische Situation als B bezeichnet. Nomogramme der Toxizität werden durch Behandlung der Situation A in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen einer toxischen Verbindung als Referenz innerhalb variabler Zeiträume erhalten. An verschiedenen Punkten der Nomogramme der Toxizität werden qualitative differentielle Banken (Banken-Paare), in diesem Beispiel rA/cB und rB/cA beschränkte Banken, gebildet. Die Banken-Paare werden vorzugsweise auf einem Träger angebracht. Der Träger wird dann mit Sonden hybridisiert, die von Proben stammen, die zunächst mit verschiedenen Dosen der Testverbindung behandelten werden: Produkte X, Y und Z. Die Hybridisierung wird durchgeführt und macht das toxische Potenzial der Testprodukte sichtbar: in diesem Beispiel zeigt das Produkt Z eine starke Toxizität und das Produkt Y stellt ein mittleres Profil dar. Die Durchführbarkeit dieser Erstellung von Nomogrammen für die Toxizität ist mit dem Beispiel der weiter oben beschriebenen Bildung von Banken des qualitativen differentiellen Screenings gut veranschaulicht, wo Ethanol und Hep2G-Zellen eingesetzt sind

4.2. Die Bewertung der Wirksamkeit einer pharmazeutischen Zusammensetzung ([Fig. 14](#)):

[0219] In diesem Beispiel wird ein beschränktes Banken-Paar gemäß der Erfindung aus einem pathologischen Modell B und einem gesunden Modell A (oder aus einem pathologischen Modell, das mit einem Wirkstoff als Referenz behandelt ist) hergestellt. Die differentiellen Banken rA/cB und rB/cA sind gegebenenfalls auf einem Träger angebracht. Dieses Banken-Paar fasst die Spleißunterschiede zwischen den beiden Situationen zusammen. Dieses Banken-Paar erlaubt die Bewertung der Wirksamkeit einer Testverbindung, nämlich deren Fähigkeit zu bestimmen, ein Muster „gesund“ (rA/cB) aus dem pathologischen Profil (rB/cA) zu erzeugen. In diesem Beispiel wird das Banken-Paar mit Sonden hybridisiert, die von den Situationen A und B mit und ohne Behandlung der Testverbindung hergestellt sind. Das Hybridisierungsmuster, das erhalten werden kann, ist in [Fig. 14](#) dargestellt. Die Durchführbarkeit dieser Anwendung ist dieselbe wie die bei der weiter oben gezeigten Bildung der Banken für qualitative Unterschiede, die für gesunde und toxische Situationen charakteristisch sind. Die toxische Situation wird durch den pathologischen Zustand ersetzt und es ist möglich, die Fähigkeit einer Testverbindung abzuschätzen, eine Sonde zu produzieren, die vorzugsweise mehr oder weniger mit der Referenzsituation oder der pathologischen Situation hybridisiert.

4.3. Die Vorhersage der Antwort einer biologischen Probe auf eine Behandlung ([Fig. 15](#)):

[0220] In diesem Beispiel wird ein beschränktes Banken-Paar gemäß der Erfindung aus zwei pathologischen Modellen hergestellt, wo das eine auf eine Behandlung mit einem bestimmten Produkt antwortet (zum Beispiel Wildtyp-p53): Situation A; und das andere Modell hierfür resistent ist: Situation B. Dieses Banken-Paar (rA/cB; rB/cA) ist auf einem Träger angebracht.

[0221] Dieses Banken-Paar wird anschließend zur Bestimmung der Empfindlichkeit einer biologischen Testprobe auf dasselbe Produkt verwendet. Hierfür wird dieses Banken-Paar mit Sonden hybridisiert, die von Biopsien von Patienten stammen, deren Antwort auf die Referenzbehandlung man vorhersagen möchte. Das Hybridisierungsmuster einer Biopsie eines reagierenden Patienten und einer Biopsie eines nichtreagierenden Patienten ist in [Fig. 15](#) dargestellt.

4.4. Die Identifizierung von Liganden für Orphan-Rezeptoren

[0222] Die Aktivierung von Membran- oder Kernrezeptoren durch ihre Liganden könnte Fehlregulationen in der Spleißung bestimmter RNAs spezifisch induzieren. Die Identifizierung dieser Ereignisse mit den DATAS-Verfahren der Erfindung erlaubt, über ein Werkzeug zu verfügen (Marker, Banken, Kits, etc.), um die Aktivierung von Rezeptoren zu verfolgen, die für die Suche von natürlichen oder synthetischen Liganden von Rezeptoren insbesondere Orphan-Rezeptoren zweckdienlich sind. Gemäß dieser Anwendung werden mit den Fehlregulationen verbundene Marker identifiziert und auf Trägern angebracht. Die Gesamt-RNA von Zellen, die den zu untersuchenden Rezeptor (über)exprimieren und mit verschiedenen Zusammensetzungen und/oder Testverbindungen behandelt oder nichtbehandelt sind, wird extrahiert und als Sonde in einer Hybridisierung mit den Trägern verwendet. Das Aufzeigen einer Hybridisierung mit bestimmten, sogar mit der Gesamtheit der auf dem Träger angebrachten Marker weist darauf hin, dass der zu untersuchende Rezeptor aktiviert worden ist und folglich dass die entsprechende Zusammensetzung/Verbindung einen Liganden besagten Rezeptors bildet oder umfasst.

4.5. Die Identifizierung von therapeutischen Zielen von Interesse:

[0223] Dies erfolgt durch die Identifizierung von Genen; deren Spleißung bei einer Erkrankung oder in einem pathologischen Modell modifiziert ist, und genauer durch die Identifizierung der modifizierten Exons und Introns. Dieser Versuchsansatz muss einen Zugang zu Sequenzen erlauben, die die funktionellen Domänen codieren, die bei Erkrankungen oder jedem physiopathologischen Phänomen gestört sind, die zum Beispiel Phänomene der Proliferation, Differenzierung oder Apoptose betreffen.

[0224] Ein Beispiel für den Beitrag des qualitativen differentiellen Screenings für die Identifizierung von differentiell gespleißten Genen wird von der DATAS-Anwendung bei einem Modell der Apoptoseinduktion durch die Expression von Wildtyp-p53 geliefert. Dieses Zellmodell ist durch Transfektion eines für das Tumorsuppressorgen p53 induzierbaren Expressionssystems etabliert worden. Um die qualitativen Unterschiede zu identifizieren, die mit der von p53 induzierten Apoptose spezifisch verbunden sind, ist DATAS mit den Messenger-RNA-Extrakten der induzierten und nicht induzierten Zellen durchgeführt worden. Für diese Versuche sind 200 ng polyA+ RNA und 200 ng cDNA für die Bildung der Heteroduplexe verwendet worden. Einhundert Klone sind aus jeder Kreuzhybridisierung erhalten worden. Die Hybridisierung dieser bakteriellen Klone, dann der cDNA-Fragmente, die sie enthalten, mit Sonden, die für Gesamt-Messenger-RNA der Anfangssituationen repräsentativ sind hat die Identifizierung von Sequenzen erlaubt, die bei der starken Induktion von p53 spezifisch exprimiert sind, die zum Zelltod führt ([Fig. 16](#)).

[0225] Diese Fragmente stammen von Exon- oder Intronsequenzen, die die Eigenschaft der vorliegenden Botschaft modulieren und erlauben, die funktionellen Domänen vorzuschlagen, an denen sie beteiligt sind oder die sie als Interventionsziele unterbrechen, um den Zelltod zu induzieren oder zu inhibieren.

[0226] Ein derartiger Versuchsansatz führt ebenfalls zur Bildung eines Banken-Paars, das differentiell gespleißte Ereignisse zwischen einer Nichtapoptosesituation und einer Apoptosesituation sammelt. Dieses Banken-Paar kann ebenfalls zum Testen der Hybridisierungsleistung einer Sonde, die von einer anderen physiopathologischen Situation oder einer besonderen Behandlung stammt, verwendet sein. Das Ergebnis einer derartigen Hybridisierung wird Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Genexpressionsprogramms der getesteten Situation versus Apoptosesituation liefern.

[0227] Wie es aus der vorhergehenden Beschreibung hervorgeht, betrifft die Erfindung ebenfalls:

- jede Nucleinsonde, jedes Oligonucleotid, jeden Antikörper, der gegen eine Sequenz gerichtet ist, die mit der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Technik identifiziert ist, und dadurch gekennzeichnet sind, dass sie eine Charakterisierung einer pathologischen Situation erlauben,
- die Verwendung der Informationen, die aus der Anwendung der beschriebenen Techniken gewonnen sind, für die Suche nach organischen Molekülen für therapeutische Zwecke durch die Bereitstellung von Screenings, die dadurch gekennzeichnet sind, dass sie auf die zwischen einer gesunden Situation und einer pathologischen Situation differentiell gespleißten Domänen abzielen, oder dadurch gut gekennzeichnet sind, dass sie auf der Hemmung der von dem Protein erworbenen Funktionsgewinne beruhen, das aus einer differentiellen Spleißung resultiert.
- die Verwendung der Informationen, die aus den in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Techniken gewonnen sind, für gentherapeutische Anwendungen,
- die Verwendung von cDNAs, die mit Hilfe der Gentherapie transferiert und dadurch gekennzeichnet sind, dass sie antagonistische oder agonistische Eigenschaften auf definierte zelluläre Signalisationswege besitzen,
- jede Bildung und jede Verwendung molekularer Banken von alternativen Exons oder Introns zum Zwecke: der Diagnose oder für kommerzielle Reagenzien für die Forschung
- der Bildung oder Suche von Molekülen, Polypeptiden, Nucleinsäuren für eine therapeutische Anwendung,
- jede Bildung und jede Verwendung von virtuellen Datenbanken, die alternative Exons und Introns zusammenfassen, dadurch gekennzeichnet, dass diese Banken erlauben, Nucleinsonden oder Oligonucleotid-Primer mit dem Ziel zu erhalten, die alternativen Spleißungen zu charakterisieren, die zwei verschiedene physiopathologische Zustände unterscheiden,
- jede pharmazeutische oder diagnostische Zusammensetzung, umfassend Polypeptide, Sense- oder Antisense-Nucleinsäuren oder chemische Moleküle, die in der Lage sind, mit alternativen Spleißprodukten zu interferieren, die mit den Techniken der Erfindung aufgezeigt und kloniert werden.
- jede pharmazeutische oder diagnostische Zusammensetzung, umfassend Polypeptide, Sense- oder Antisense-Nucleinsäuren oder chemische Moleküle, die in der Lage sind, eine Spleißung wiederherzustellen, die für eine normale Situation repräsentativ ist, im Gegensatz zu dem alternativen Ereignis, das für eine pathologische Situation charakteristisch ist.

5. DEREGLATIONEN DER SPLEISSMECHANISMEN DER RNAs MIT TOXISCHEN AGENTIEN

[0228] Dieses Beispiel zeigt, dass die Unterschiede von Spleißformen und/oder Spleißmustern als Marker für das Verfolgen und/oder die Detektion der Toxizität und/oder der Wirksamkeit von Verbindungen verwendet sein kann.

[0229] Die Wirkungen toxischer Agentien auf die Deregulationen von Spleißungen der RNAs sind folgendermaßen getestet worden. HepG2-Hepatocyten sind mit verschiedenen Dosen dreier toxischer Verbindungen (Ethanol, Camptothecin, PMA (Phorbol 12-Myristat 13-Acetat)) behandelt worden. Zwei Cytotoxizitätstest (Trypan-Blau, MTT) sind mit verschiedenen Zeiten durchgeführt worden: 4 h und 18 h mit Ethanol; 4 h und 18 h mit Camptothecin; 18 h und 40 mit PMA.

[0230] Das Trypan-Blau ist ein Farbstoff, der von lebenden Zellen inkorporiert wird. Ein einfacher Vergleich der „blauen“ und „weißen“ Zellen unter dem Mikroskop erlaubt den Prozentsatz lebender Zellen nach Behandlung oder die Überlebensrate zu bestimmen. Die Punkte sind dreifach bestimmt.

[0231] Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Test, der die Fähigkeit lebender Zellen misst, die löslichen Tetrazoliumsalze (MTT) in einen unlöslichen Formazan-Niederschlag umzuwandeln. Diese dunkelblauen Formazan-Kristalle können gelöst werden und ihre Konzentration durch Absorptionsmessungen bei 550 nm bestimmt werden. Daher werden nach Beimpfen der Platten mit 24 Vertiefungen mit je 150000 Zellen über Nacht, dann Behandlung der Zellen mit den toxischen Verbindungen werden 50 µl MTT (Sigma) (in 5 mg/ml in PBS) zugegeben. Die Bildungsreaktion von Formazan-Kristallen vollzieht sich in 5 h in einem CO₂-Inkubator (37°C, 5% CO₂, 95% Luftfeuchtigkeit). Nach Zugabe von 500 µl Solubilisierungslösung (0,1 N HCl in Isopropanol-Triton X-100 (10%)) werden die Kristalle unter Rühren gelöst und die Absorption bei 550 bis 660 nm gemessen. Die Punkte sind dreifach mit den geeigneten Kontrollen (Viabilität, Zelltod, Kontrolle) gemessen worden.

[0232] Ein Test der Apoptose oder des programmierten Zelltods ist ebenfalls durch Messen der DNA-Fragmentierung unter Verwendung von anti-Histon Antikörpern und ELISA-Messungen durchgeführt worden. Der angewandte Test ist der Cell Death ELISA Plus von Roche.

[0233] Die Ergebnisse dreier Tests ([Fig. 18A](#), B, C) haben die Bestimmung folgender Dosen erlaubt:

- Ethanol: 0,1 M
- Camptothecin: 1 µg/ml
- PMA: 50 ng/ml

die viel niedriger waren als die gemessenen IC₅₀

[0234] Die HepG2-Zellen sind daher mit diesen drei Verbindungen mit drei Dosen 4 h mit Ethanol und Camptothecin und 18 h mit PMA behandelt worden. Die Messenger-RNAs sind mit Dynal-Oligo-(dT) Kügelchen aus mit dem Rneasy Kit (Qiagen) gereinigten Gesamt-RNAs aufgereinigt worden. cDNA-Synthesen sind aus diesen Messenger-RNAs und mit der inversen Transkriptase Superscript (Life Technologies) unter Verwendung von zufälligen Hexameren als Primer durchgeführt worden.

[0235] Die ersten Stränge haben als Matrizen für die Amplifikationsreaktionen mittels PCR (94°C 1 min 55°C 1 min, 72°C 1 min, 30 Cyclen) mit Hilfe folgender Oligonucleotid-Primer gedient:

MACH-α:

5'-TGCCCAAATCAACAAGAGC-3' (SEQ ID NR: 11)
5'-CCCCTGACAAGCCTGAATA-3' (SEQ ID NR: 12)

[0236] Diese Primer entsprechen Regionen, die verschiedenen beschriebenen Isoformen von MACH-α gemeinsam sind (1, 2 und 3, die jeweils 595, 550 und 343 Basenpaare amplifizieren). MACH-α (Caspase-8) ist eine am programmierten Zelltod beteiligte Protease (Boldin et al., Cell (1996), 85, 803-815).

BCL-X

5'-ATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTG-3' (SEQ ID NR: 13)
5'-GTGGCTCCATTCACCGCGGGGCTG-3' (SEQ ID NR: 14)

[0237] Diese Primer entsprechen Regionen, die verschiedenen beschriebenen Isoformen von bcl-x (bcl-XI, bcl-Xs, BCL-Xβ) gemeinsam sind (Boise et al., Cell (1993) 74, 597-608; U72398 (Genbank)) und ein einziges Fragment für diese drei Isoformen von 204 Basenpaaren amplifizieren müssen.

FASR

5'-TGCCAAGAAGGGAAGGAGT-3' (SEQ ID NR: 15)
5'-TGTCATGACTCCAGCAATAG-3' (SEQ ID NR: 16)

[0238] Diese Primer entsprechen Regionen, die bestimmten Isoformen von FASR gemeinsam sind, und ein Fragment von 478 Basenpaaren für die Wildform von FASR, 452 für die Δ8-Isoform und 415 für die ΔTM-Isoform amplifizieren müssen.

[0239] Die Ergebnisse mit Bezug auf [Fig. 19](#) zeigen, dass:

- Camptothecin eine Verringerung der Expression der MACH-α1 Isoform und eine Erhöhung der MACH-α3 Isoform induziert.
- Camptothecin das Auftreten einer neuen Isoform von bcl-X induziert (obere Bande des Doublets, das in Richtung 200 Basenpaare migriert).
- Camptothecin eine Verringerung der Wildform des fas-Rezeptors induziert, die durch eine Expression der kürzeren Isoform ersetzt ist, die Fas ΔTM entsprechen kann.
- Ethanol das Verschwinden von bcl-X induziert, das durch eine kürzere Isoform ersetzt ist.
- Ethanol eine Vermehrung der langen, Wildform des fas-Rezeptors auf Kosten der kürzeren Isoform induziert.

[0240] Diese Ergebnisse zeigen, dass Behandlungen mit toxischen Agentien mit geringen Dosen Fehlregulationen von alternativen Spleißungen von bestimmten RNAs auf spezifische Weise induzieren können. Die Identifizierung dieser Fehlregulationen auf posttranskriptionaler Ebene, insbesondere durch Anwendung der DATAS-Technologie, erlaubt daher ein Instrument zur Vorhersage der Toxizität von Molekülen zu definieren.

SEQUENZLISTE

<110> EXONHIT THERAPEUTICS SA

<120> QUALITATIVES DIFFERENTIELLES SCREENING

<130> B3898B - PB/KM

<140>

<141>

<150> 9802997

<151> 1998-03-11

<160> 16

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 1

gagaagcggtt atnnnnnnna ggn

23

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 2

gagaagcggtt atnnnnnnnn tccc

24

<210> 3

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 3

gagaagcgtt atnnnnnnnnn -nnn

23

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 4

gagaagcgtt atnnnnnncca

20

<210> 5

<211> 66

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 5

ccacacctgg ccagtatgtg ctactgggt tgcagagtgg gcagccagcc taagcatttg 60
cactgg 66

<210> 6

<211> 23

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 6

gggacctgtt tgacatgaag ccc

23

<210> 7

<211> 22

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 7

cagtttccgc tccacaggtt gc

22

<210> 8

<211> 96

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 8

gtacgggaga gcacgaccac acctggccag tatgtgctca ctggcttgca gaggggcag 60
 cctaagcatt tgctactggg ggaccctgag ggtgtg 96

<210> 9

<211> 441

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Met Asn Lys Leu Ser Gly Gly Gly Gly Arg Arg Thr Arg Val Glu Gly
 1 5 10 15
 Gly Gln Leu Gly Gly Glu Glu Trp Thr Arg His Gly Ser Phe Val Asn
 20 25 30
 Lys Pro Thr Arg Gly Trp Leu His Pro Asn Asp Lys Val Met Gly Pro
 35 40 45
 Gly Val Ser Tyr Leu Val Arg Tyr Met Gly Cys Val Glu Val Leu Gln
 50 55 60
 Ser Met Arg Ala Leu Asp Phe Asn Thr Arg Thr Gln Val Thr Arg Glu
 65 70 75 80
 Ala Ile Ser Leu Val Cys Glu Ala Val Pro Gly Ala Lys Gly Ala Thr
 85 90 95
 Arg Arg Arg Lys Pro Cys Ser Arg Pro Leu Ser Ser Ile Leu Gly Arg
 100 105 110
 Ser Asn Leu Lys Phe Ala Gly Met Pro Ile Thr Leu Thr Val Ser Thr
 115 120 125
 Ser Ser Leu Asn Leu Met Ala Ala Asp Cys Lys Gln Ile Ile Ala Asn
 130 135 140
 His His Met Gln Ser Ile Ser Phe Ala Ser Gly Gly Asp Pro Asp Thr
 145 150 155 160
 Ala Glu Tyr Val Ala Tyr Val Ala Lys Asp Pro Val Asn Gln Arg Ala
 165 170 175
 Cys His Ile Leu Glu Cys Pro Glu Gly Leu Ala Gln Asp Val Ile Ser
 180 185 190
 Thr Ile Gly Gln Ala Phe Glu Leu Arg Phe Lys Gln Tyr Leu Arg Asn
 195 200 205

Pro Pro Lys Leu Val Thr Pro His Asp Arg Met Ala Gly Phe Asp Gly
 210 215 220
 Ser Ala Trp Asp Glu Glu Glu Glu Glu Pro Pro Asp His Gln Tyr Tyr
 225 230 235 240
 Asn Asp Phe Pro Gly Lys Glu Pro Pro Leu Gly Gly Val Val Asp Met
 245 250 255
 Arg Leu Arg Glu Gly Ala Ala Pro Gly Ala Ala Arg Pro Thr Ala Pro
 260 265 270
 Asn Ala Gln Thr Pro Ser His Leu Gly Ala Thr Leu Pro Val Gly Gln
 275 280 285
 Pro Val Gly Gly Asp Pro Glu Val Arg Lys Gln Met Pro Pro Pro Pro
 290 295 300
 Pro Cys Pro Gly Arg Glu Leu Phe Asp Asp Pro Ser Tyr Val Asn Val
 305 310 315 320
 Gln Asn Leu Asp Lys Ala Arg Gln Ala Val Gly Gly Ala Gly Pro Pro
 325 330 335
 Asn Pro Ala Ile Asn Gly Ser Ala Pro Arg Asp Leu Phe Asp Met Lys
 340 345 350
 Pro Phe Glu Asp Ala Leu Arg Val Pro Pro Pro Pro Gln Ser Val Ser
 355 360 365
 Met Ala Glu Gln Leu Arg Gly Glu Pro Trp Phe His Gly Lys Leu Ser
 370 375 380
 Arg Arg Glu Ala Glu Ala Leu Leu Gln Leu Asn Gly Asp Phe Leu Val
 385 390 395 400
 Arg Thr Lys Asp His Arg Phe Glu Ser Val Ser His Leu Ile Ser Tyr
 405 410 415
 His Met Asp Asn His Leu Pro Ile Ile Ser Ala Gly Ser Glu Leu Cys
 420 425 430
 Leu Gln Gln Pro Val Glu Arg Lys Leu
 435 440

<210> 10

<211> 1326

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 10

atgaacaagc tgagtggagg cggcgggcgc aggactcggg tggaaggggg ccagcttggg 60
 ggcgaggagt ggaccgcga cgggagcttt gtcaataagc ccacgcgggg ctggctgcat 120

```

cccaacgaca aagtcacggg acccggggtt tcctacttgg ttcggtacat gggttgtgtg 180
gaggtcctcc agtcaatgcg tgccctggac ttcaacaccc ggactcaggt caccagggag 240
gccatcagtc tgggtgtgtga ggctgtgccg ggtgctaagg gggcgacaag gaggagaaag 300
ccctgtagcc gcccgctcag ctctatcctg gggaggagta acctgaaatt tgctggaatg 360
ccaatcactc tcaccgtctc caccagcagc ctcaacctca tggccgcaga ctgcaaacag 420
atcatcgcca accaccacat gcaatctatc tcattttgcat ccggcgggga tccggacaca 480
gccgagtatg tcgcctatgt tgccaaagac cctgtgaatc agagagcctg ccacattctg 540
gagtgtcccc aagggcttgc ccaggatgtc atcagcacca ttggccaggc cttcgagttg 600
cgcttcaaac aatacctcag gaaccacccc aaactgggtc cccctcatga caggatggct 660
ggctttgatg gctcagcatg ggatgaggag gaggaagagc cacctgacca tcagtactat 720
aatgacttcc cggggaagga accccccttg ggggggggtg tagacatgag gcttcgggaa 780
ggagccgctc caggggctgc tcgaccact gcacccaatg ccagacccc cagccacttg 840
ggagctacat tgcctgtagg acagcctgtt gggggagatc cagaagtccg caaacagatg 900
ccacctccac caccctgtcc aggcagagag ctttttgatg atccctccta tgtcaacgtc 960
cagaacctag acaaggcccc gcaagcagtg ggtggtgctg ggcccccaa tcctgctatc 1020
aatggcagtg cccccggga cctgtttgac atgaagccct tcgaagatgc tcttcgggtg 1080
cctccacctc cccagtcggt gtccatggct gaggagctcc gaggggagcc ctggttccat 1140
gggaagctga gccggcggga ggctgaggca ctgctgcagc tcaatgggga cttcttggtt 1200
cggactaagg atcaccgctt tgaaagtgtc agtcacctta tcagctacca catggacaat 1260
cacttgccca tcattctctg gggcagcgaa ctgtgtctac agcaacctgt ggagcggaaa 1320
ctgtga
1326

```

<210> 11

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 11

```

tgcccaaadc aacaagagc
19

```

<210> 12

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 12

```

cccctgacaa gcctgaata
19

```

<210> 13

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 13

atgtctcaga gcaaccggga gctg

24

<210> 14

<211> 24

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 14

gtggctccat tcaccgcggg gctg

24

<210> 15

<211> 19

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 15

tgcccaagaag ggaaggagt

19

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz: OLIGO

<400> 16

tgtcatgact ccagcaatag

20

Patentansprüche

1. Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäure-Regionen, die für qualitative genetische Unterschiede zwischen zwei biologischen Proben repräsentativ sind, umfassend einen Schritt der Hybridisierung zwischen der RNA oder doppelsträngiger cDNA, die aus einer ersten biologischen Probe stammt, und der cDNA, die aus einer zweiten biologischen Probe stammt, und die Identifizierung und/oder Klonierung, aus den gebildeten Hybridisierungskomplexen, von nicht gepaarten Nucleinsäure-Regionen, wobei besagte Regionen Nucleinsäuren umfassen, die für qualitative genetische Unterschiede zwischen den beiden Proben repräsentativ sind.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es umfasst:

- (a) die Hybridisierung von RNA, die aus der ersten Probe (Testzustand) stammt, mit der cDNA, die aus der zweiten Probe (Referenzzustand) stammt;
- (b) die Hybridisierung von RNA, die aus der zweiten Probe (Referenzzustand) stammt, mit der cDNA, die aus der ersten Probe (Testzustand) stammt; und
- (c) die Identifizierung und/oder Klonierung, aus den in (a) und (b) gebildeten Hybriden, von Nucleinsäuren, die qualitativen genetischen Unterschieden entsprechen.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridisierungen zwischen RNA und einzelsträngiger cDNA erfolgen und dass es die Identifizierung und/oder Klonierung von nicht gepaarten RNA-Regionen umfasst.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es die Hybridisierung zwischen doppelsträngiger cDNA, die aus einer ersten biologischen Probe stammt, und einzelsträngiger cDNA, die aus einer zweiten biologischen Probe stammt, umfasst.

5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 3 oder 4, dadurch gekennzeichnet, dass die Klonierung der Nucleinsäuren die inverse Transkription und/oder die Amplifikation mit Hilfe zufälliger oder halbzufälliger Primer umfasst, insbesondere Primer mit der Sequenz GAGAAGCGTTATNNNNNNNWXYZ, in der N anzeigt, dass jede der vier Basen an der angegebenen Position in zufälliger Weise stehen kann, W, X und Y jeweils für eine bestimmte Base stehen und Z entweder für eine bestimmte Base oder für eine 3'-OH-Gruppe steht.

6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe aus Zellen, einem Gewebe, einem Organ oder einer Biopsie besteht.

7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Identifizierung und/oder Klonierung differenzieller alternativer Spleißungen zwischen Tumorzellen und Nichttumorzellen.

8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Identifizierung und/oder Klonierung differenzieller alternativer Spleißungen zwischen mit einer Testverbindung behandelten Zellen und nichtbehandelten Zellen.

9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6 zur Identifizierung und/oder Klonierung differenzieller alternativer Spleißungen zwischen Apoptosezellen und nicht apoptotischen Zellen.

10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Hybridisierung in flüssiger Phase durchgeführt ist.

11. Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäure-Regionen, die in zwei physiologischen Zuständen A und B differenziell gespleißt sind, umfassend

- (a) die Heteroduplex-Bildung in flüssiger Phase zwischen der Messenger-RNA, die vom Zustand A stammt, und der cDNA, die einerseits vom Zustand B stammt;
- (b) die Heteroduplex-Bildung in flüssiger Phase zwischen der Messenger-RNA, die vom Zustand B stammt, und der cDNA, die andererseits vom Zustand A stammt;
- (c) die Identifizierung und/oder Klonierung der nicht gepaarten RNA-Regionen in den in (a) und (b) erhaltenen Heteroduplexen.

12. Verfahren zur Identifizierung und/oder Klonierung von Nucleinsäure-Regionen, die in zwei physiologischen Zuständen A und B differenziell gespleißt sind, umfassend

- (a) die Heteroduplex-Bildung zwischen der Messenger-RNA, die vom Zustand A stammt, und der cDNA, die einerseits vom Zustand B stammt, wobei die RNA oder die cDNA auf einem Träger immobilisiert ist;
- (b) die Heteroduplex-Bildung zwischen der Messenger-RNA, die vom Zustand B stammt, und der cDNA, die andererseits vom Zustand A stammt, wobei die RNA oder die cDNA auf einem Träger immobilisiert ist; und
- (c) die Identifizierung und/oder Klonierung der nicht gepaarten RNA-Regionen in den in (a) und (b) erhaltenen Heteroduplexen.

13. Verfahren zur Herstellung einer Zusammensetzung, umfassend einen Träger, auf dem Nucleinsäuren präsentiert sind, umfassend:

- die Präparation von unterschiedlichen Nucleinsäuren, umfassend eine Sequenz, die komplementär und spezifisch für alternierende Exons oder Introns ist, die sich von Genen oder mRNA unterscheiden, die für einen physiologischen Zustand charakteristisch sind, wobei besagte Exons oder Introns insbesondere gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 identifizierbar sind, und

– die Präsentation dieser Nucleinsäuren auf einem Träger.

14. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäuren cDNA umfassen.
15. Verfahren gemäß Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäuren Oligonucleotide umfassen.
16. Verfahren gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäuren Oligonucleotide umfassen, die für Verbindungsregionen zwischen zwei Domänen spezifisch sind, die von einer gespleißten Domäne getrennt sind.
17. Verfahren gemäß Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonucleotide einzelsträngig sind und eine Länge zwischen einschließlich 5 und 100-mer besitzen.
18. Verfahren gemäß Anspruch 15, 16 oder 17, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Oligonucleotide mit einem Verfahren erhalten sind, umfassend:
 - (a) Identifizierung eines für einen physiopathologischen Zustand charakteristischen Spleißereignisses und der Sequenz der gespleißten Domäne;
 - (b) die künstliche Synthese eines oder mehrerer Oligonucleotide, die einer oder mehreren Regionen dieser Domäne entsprechen;
 - (c) die künstliche Synthese eines oder mehrerer Oligonucleotide, die der Verbindungsregion zwischen den zwei Domänen entsprechen, die von einer gespleißten Domäne getrennt sind; und
 - (d) die Wiederholung der obigen Schritte (a) bis (c) mit anderen für besagten physiopathologischen Zustand charakteristischen Spleißereignissen.
19. Verfahren gemäß Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Nucleinsäuren in Vektoren kloniert sind.
20. Verfahren gemäß Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der physiopathologische Zustand aus Apoptose, Neurodegeneration, Toxizität und Proliferation ausgewählt ist.
21. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, dass der Träger aus einem Filter, einer Membran oder einem Chip besteht.
22. Verwendung einer Zusammensetzung, die mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 erhalten ist, zur Identifizierung von Molekülen von therapeutischem oder diagnostischem Interesse.
23. Verwendung einer Zusammensetzung, die mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 erhalten ist, zur Identifizierung von Proteinen oder Protein-Domänen, die bei einer Krankheit verändert sind.
24. Verwendung gemäß Anspruch 23 zur Identifizierung von Antigen-Domänen, die für in einer Krankheit implizierte Proteine spezifisch sind.
25. Verwendung gemäß Anspruch 22 zur Bewertung der Toxizität einer Verbindung.
26. Verwendung gemäß Anspruch 22 zur Bewertung der therapeutischen Wirksamkeit einer Verbindung.
27. Verwendung gemäß Anspruch 22 zur Bewertung der Reaktion eines Patienten auf eine Testverbindung oder Testbehandlung.
28. Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend eine Gruppe unterschiedlicher einzelsträngiger Oligonucleotide mit einer Länge zwischen einschließlich 5 und 100-mer, umfassend eine Sequenz, die für alternierende Exons oder Introns komplementär und spezifisch ist, die sich von Genen oder mRNA unterscheiden, die für einen physiologischen Zustand charakteristisch sind, wobei besagte Exons oder Introns insbesondere gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 identifizierbar sind, um die Fähigkeit einer Person zu bestimmen, auf eine bestimmte Verbindung oder Behandlung zu reagieren.
29. Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend eine Gruppe unterschiedlicher einzelsträngiger Oligonucleotide mit einer Länge zwischen einschließlich 5 und 100-mer, umfassend eine Sequenz, die für alternierende Exons oder Introns komplementär und spezifisch ist, die sich von Genen oder mRNA unterscheiden,

die für einen physiologischen Zustand charakteristisch sind, wobei besagte Exons oder Introns insbesondere gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 identifizierbar sind, um die Prädisposition einer Person für eine Krankheit zu bestimmen.

30. Verwendung einer Zusammensetzung, umfassend eine Gruppe unterschiedlicher einzelsträngiger Oligonucleotide mit einer Länge zwischen einschließlich 5 und 100-mer, umfassend eine Sequenz, die für alternierende Exons oder Introns komplementär und spezifisch ist, die sich von Genen oder mRNA unterscheiden, die für einen physiologischen Zustand charakteristisch sind, wobei besagte Exons oder Introns insbesondere gemäß dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 12 identifizierbar sind, um die Toxizität einer Verbindung oder Behandlung zu bestimmen.

31. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 28 bis 30, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonucleotide als Primer verwendet sind.

32. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 28 bis 31, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligonucleotide für Verbindungsregionen zwischen zwei Domänen spezifisch sind, die von einer gespleißten Domäne getrennt sind.

33. Verfahren zur Bestimmung oder Bewertung der Toxizität einer Testverbindung für eine bestimmte biologische Probe, umfassend die Hybridisierung:

- einer Zusammensetzung, die mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 erhalten ist, wobei besagte Zusammensetzung Nucleinsäuren umfasst, die für alternierende Exons oder Introns von Genen oder mRNA spezifisch sind, die für besagte nichtbehandelte biologische Probe in gesundem Zustand und für besagte biologische Probe in einem oder verschiedenen toxischen Stadien, die aus einer Behandlung besagter Probe mit einer toxischen Referenzverbindung resultieren, charakteristisch sind, mit
- einem Präparat von Nucleinsäuren von der biologischen Probe, die mit besagter Testverbindung behandelt ist, und
- die Bewertung des toxischen Potenzials der Testverbindung durch eine Analyse des Hybridisierungsgrads von besagtem Präparat mit besagter Zusammensetzung.

34. Verfahren gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe eine Kultur von Hepatocyten, von Nierenepithelzellen oder Endothelzellen ist, die nichtbehandelt oder mit einem toxischen Agens behandelt ist.

35. Verfahren gemäß Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, dass die biologische Probe eine Hautkultur ist, die nichtbehandelt oder mit toxischen oder irritierenden Agenzien behandelt ist.

36. Verfahren zur Bestimmung oder Bewertung der therapeutischen Wirksamkeit einer Testverbindung auf eine bestimmte biologische Probe, umfassend die Hybridisierung:

- einer Zusammensetzung, die mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 erhalten ist, wobei besagte Zusammensetzung Nucleinsäuren umfasst, die für alternierende Exons oder Introns von Genen oder mRNA spezifisch sind, die für besagte nichtbehandelte biologische Probe und für eine mit einer therapeutischen Referenzverbindung behandelte biologische Probe charakteristisch sind, mit
- einem Präparat von Nucleinsäuren von der biologischen Probe, die mit besagter Testverbindung behandelt ist, und
- die Bewertung des toxischen Potenzials der Testverbindung durch eine Analyse des Hybridisierungsgrads von besagtem Präparat mit besagter Zusammensetzung.

37. Verfahren zur Bestimmung oder Bewertung einer Reaktion eines Patienten auf eine Testverbindung oder Testbehandlung, umfassend

- die Hybridisierung eines Präparats von Nucleinsäuren von einer pathologischen biologischen Probe besagten Patienten mit einer Zusammensetzung, die mit einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 erhalten ist, wobei besagte Zusammensetzung Nucleinsäuren umfasst, die für alternierende Exons oder Introns von Genen oder mRNA spezifisch sind, die für eine biologische Probe, die auf besagte Zusammensetzung/Behandlung reagiert, und für eine biologische Probe, die auf besagte Zusammensetzung/Behandlung schlecht oder nicht reagiert, charakteristisch sind, und
- die Bewertung des Reaktionspotenzials des Patienten durch eine Analyse des Hybridisierungsgrads besagten Präparats mit besagter Zusammensetzung.

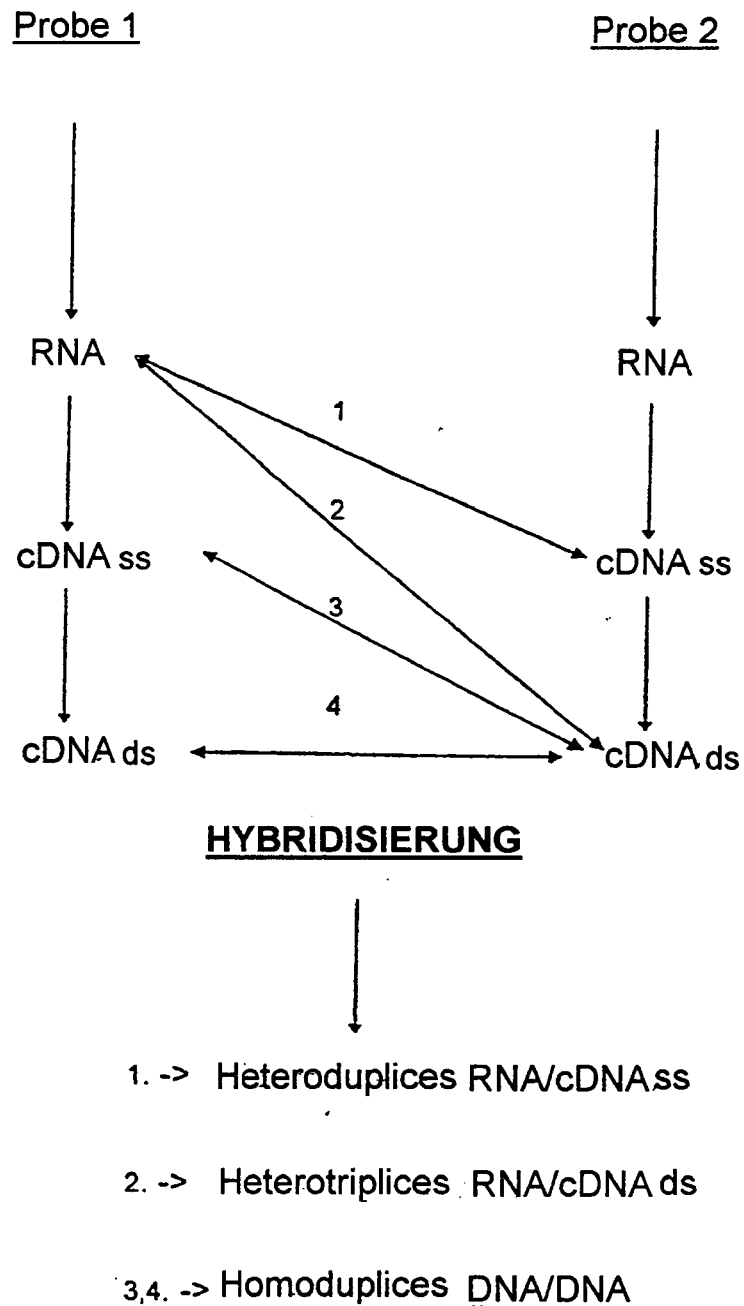
38. Verfahren gemäß Anspruch 37 zur Bestimmung oder Bewertung der Reaktion eines Patienten auf eine

Antitumor-Verbindung oder Antitumor-Behandlung.

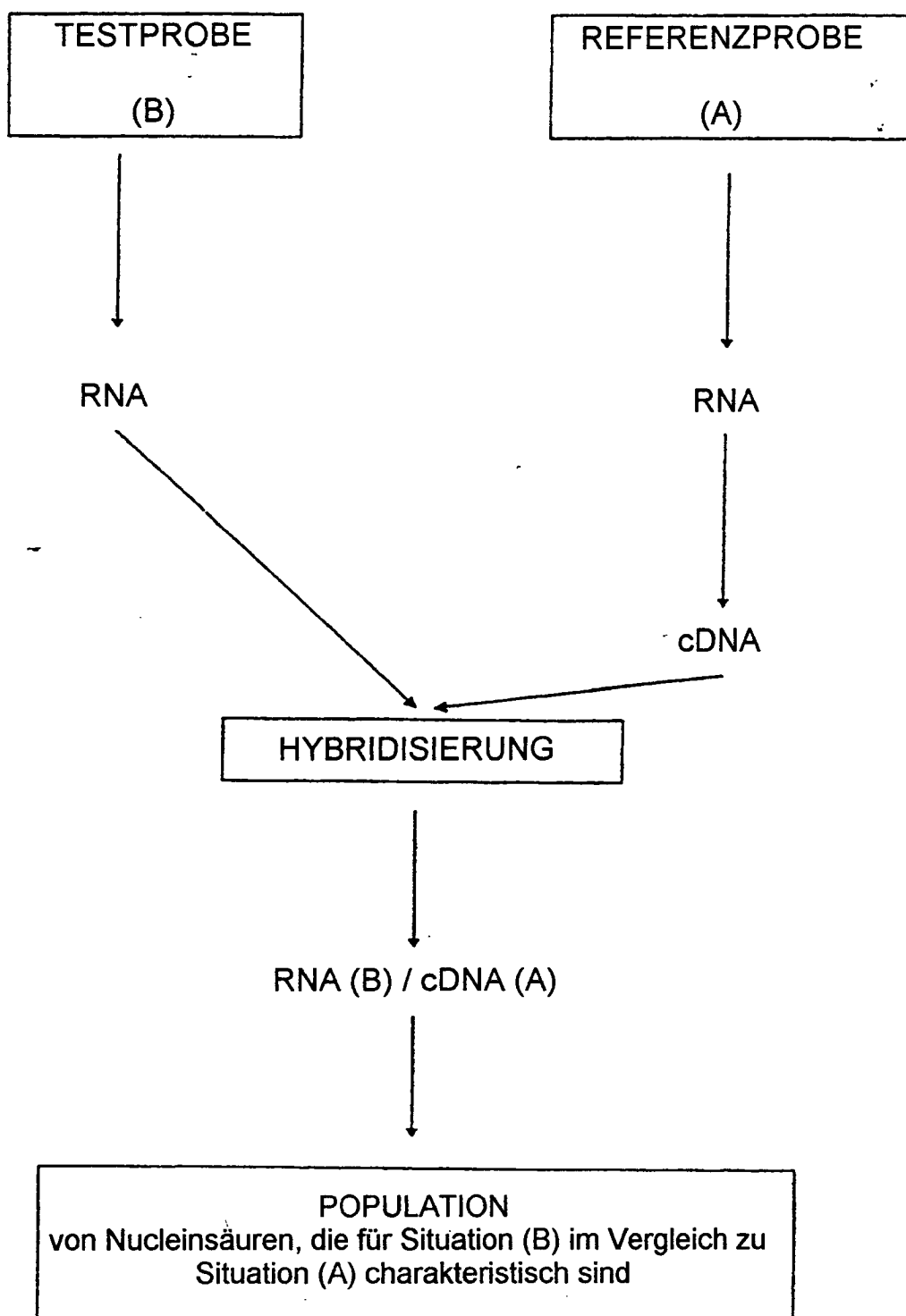
39. Verfahren gemäß Anspruch 38 zur Bestimmung oder Bewertung der Reaktion eines Patienten auf eine Antitumor-Behandlung durch Übertragung des Wildtyp p53-Gens.

Es folgen 26 Blatt Zeichnungen

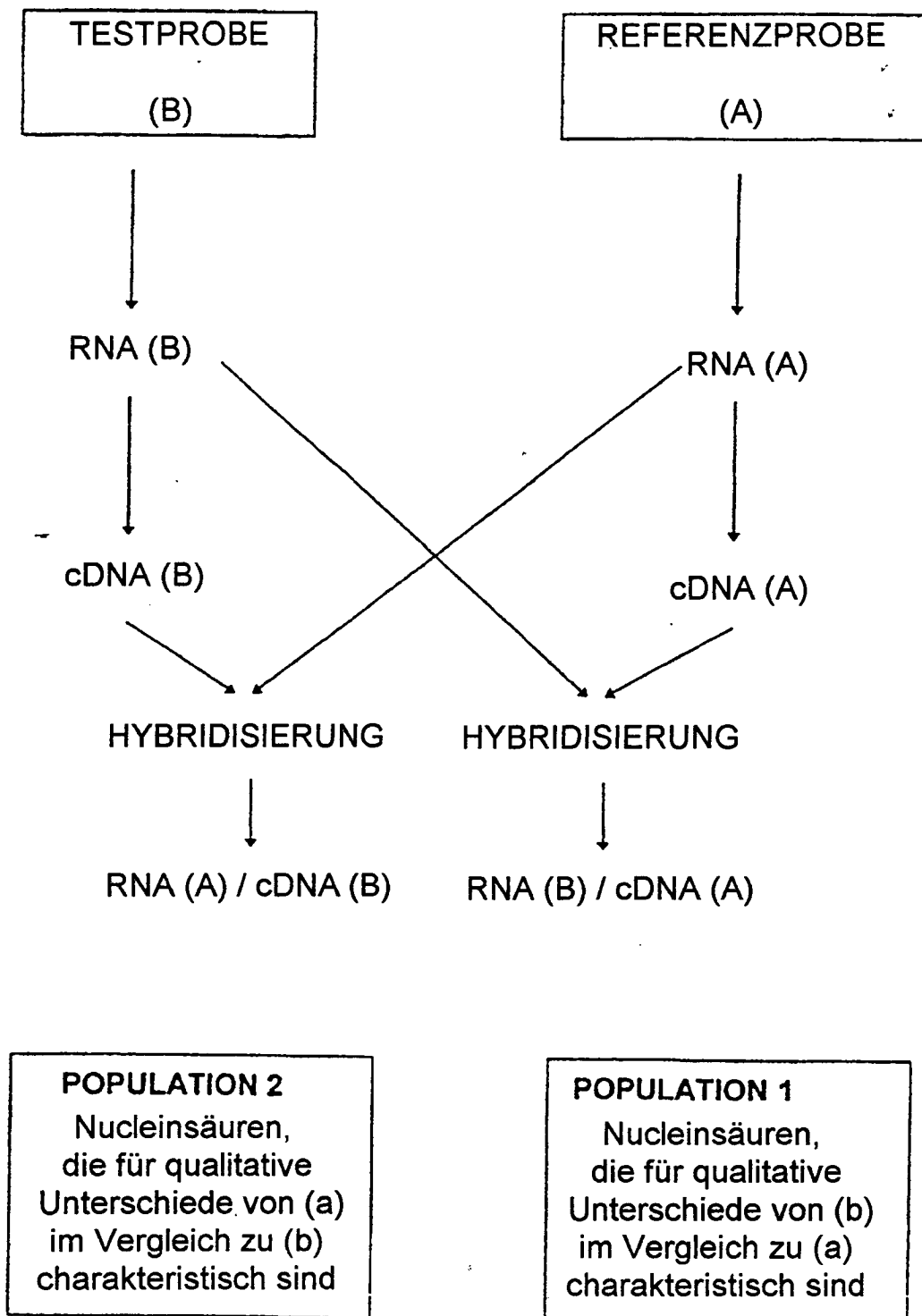
Anhängende Zeichnungen



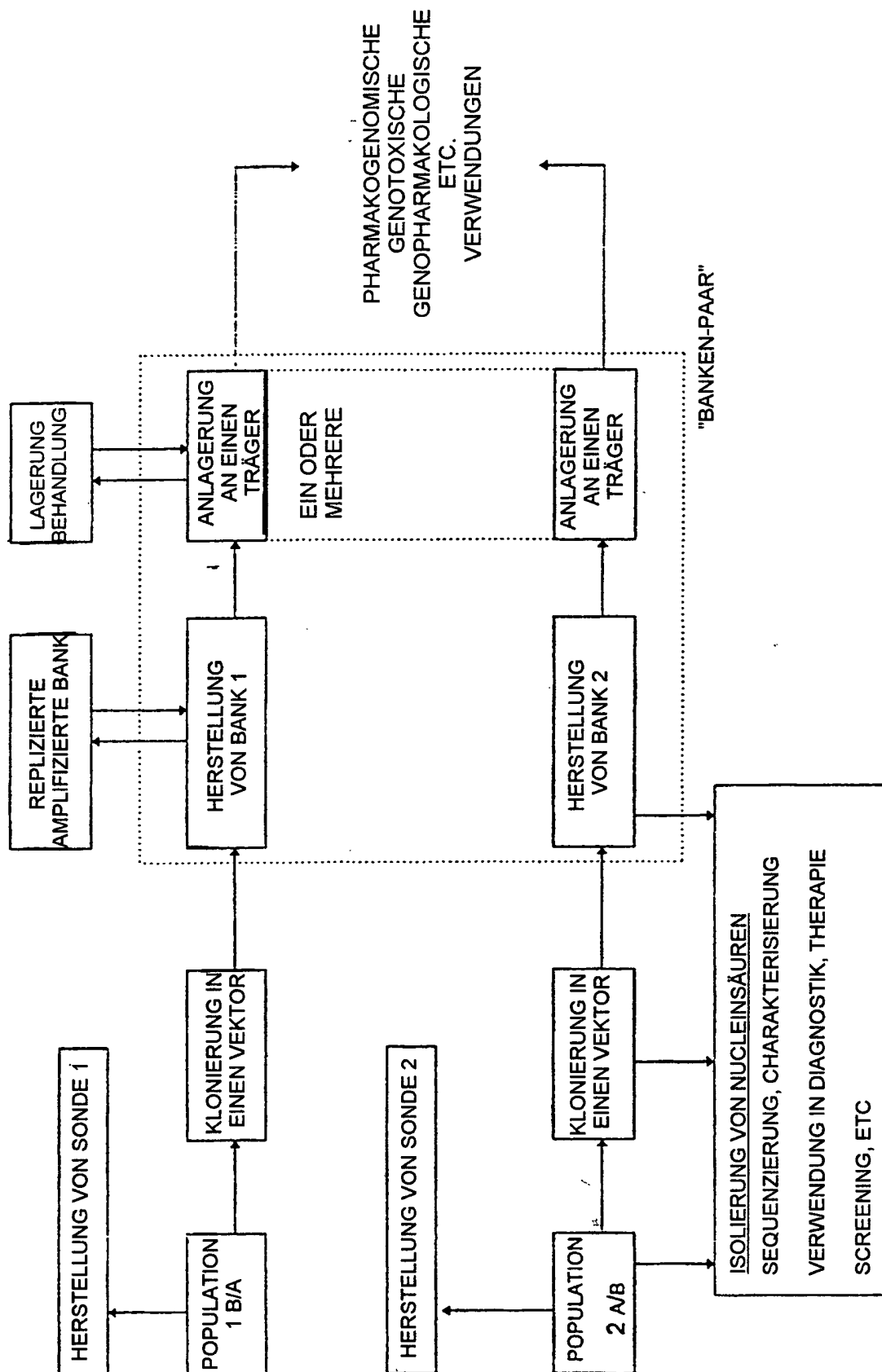
FIGUR. 1A



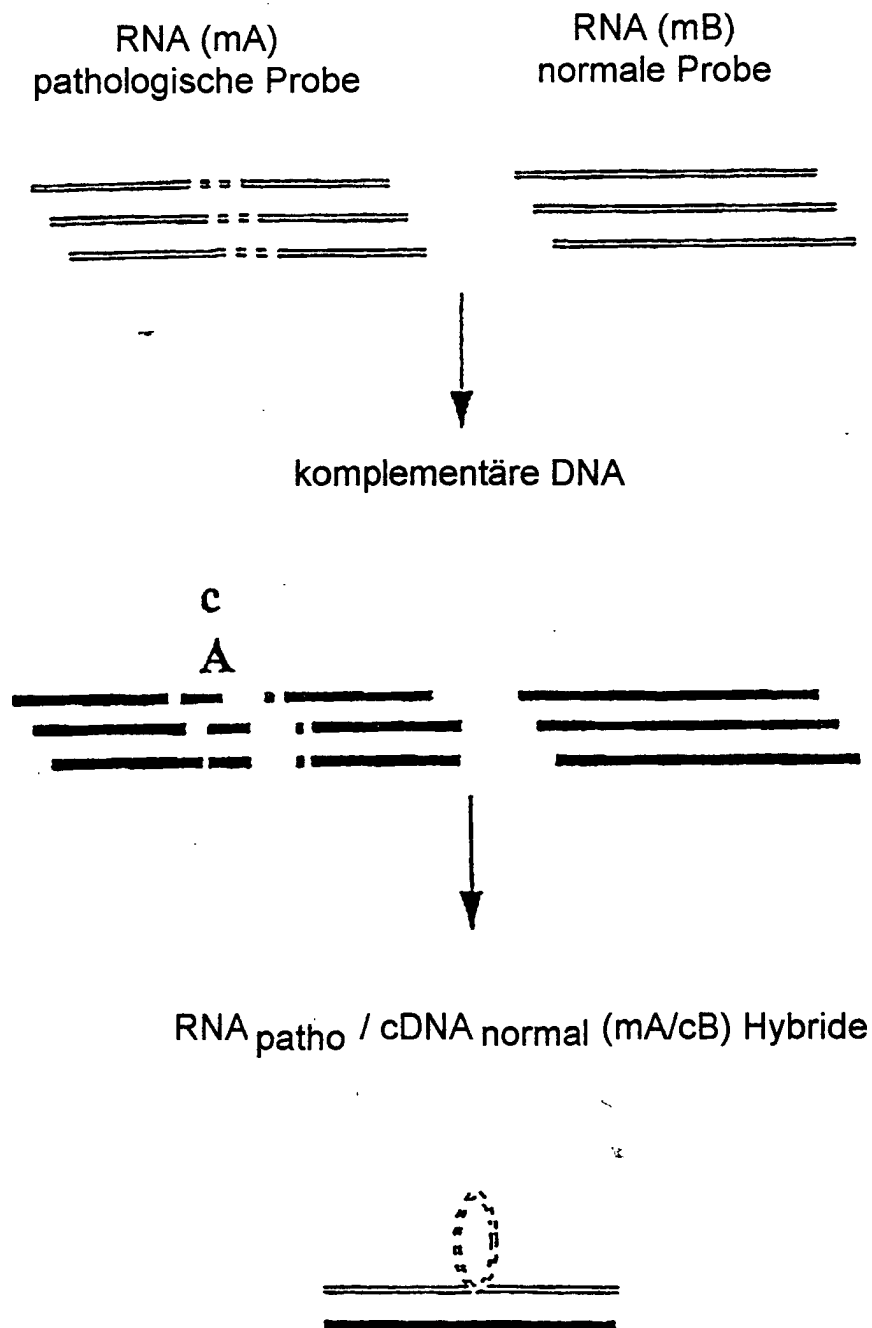
FIGUR 1B



FIGUR 1C

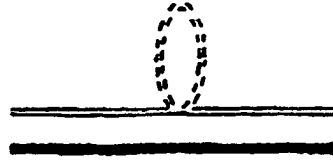


FIGUR 1D



FIGUR 2

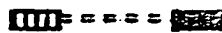
RNA_{patho} / cDNA normal Hybride



nicht gespleißte Sequenz nach RNase H Verdau



gesuchte Sequenz mit Hilfe zweier
Oligonucleotide in 5' und 3' markiert

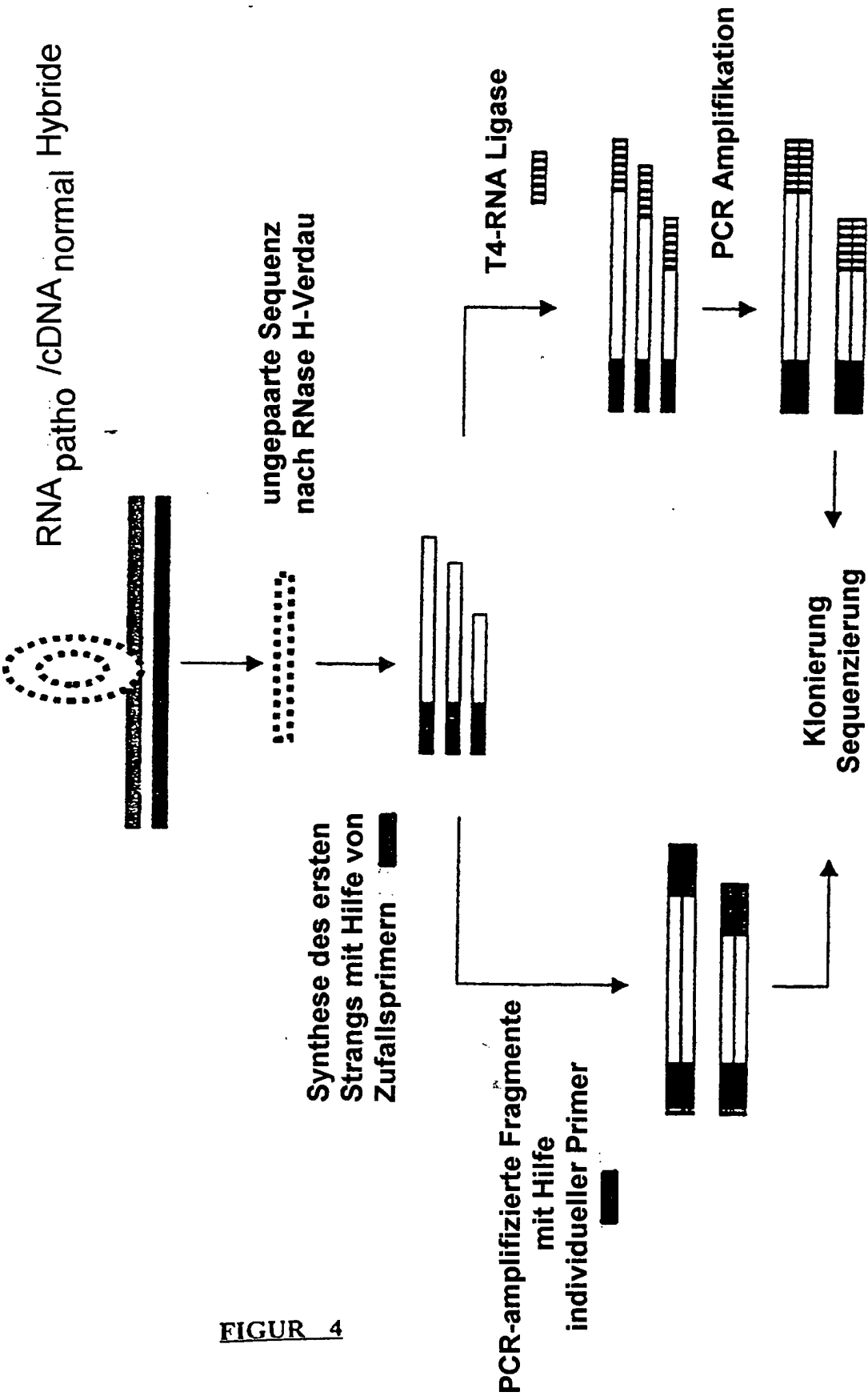


PCR-amplifiziertes Fragment

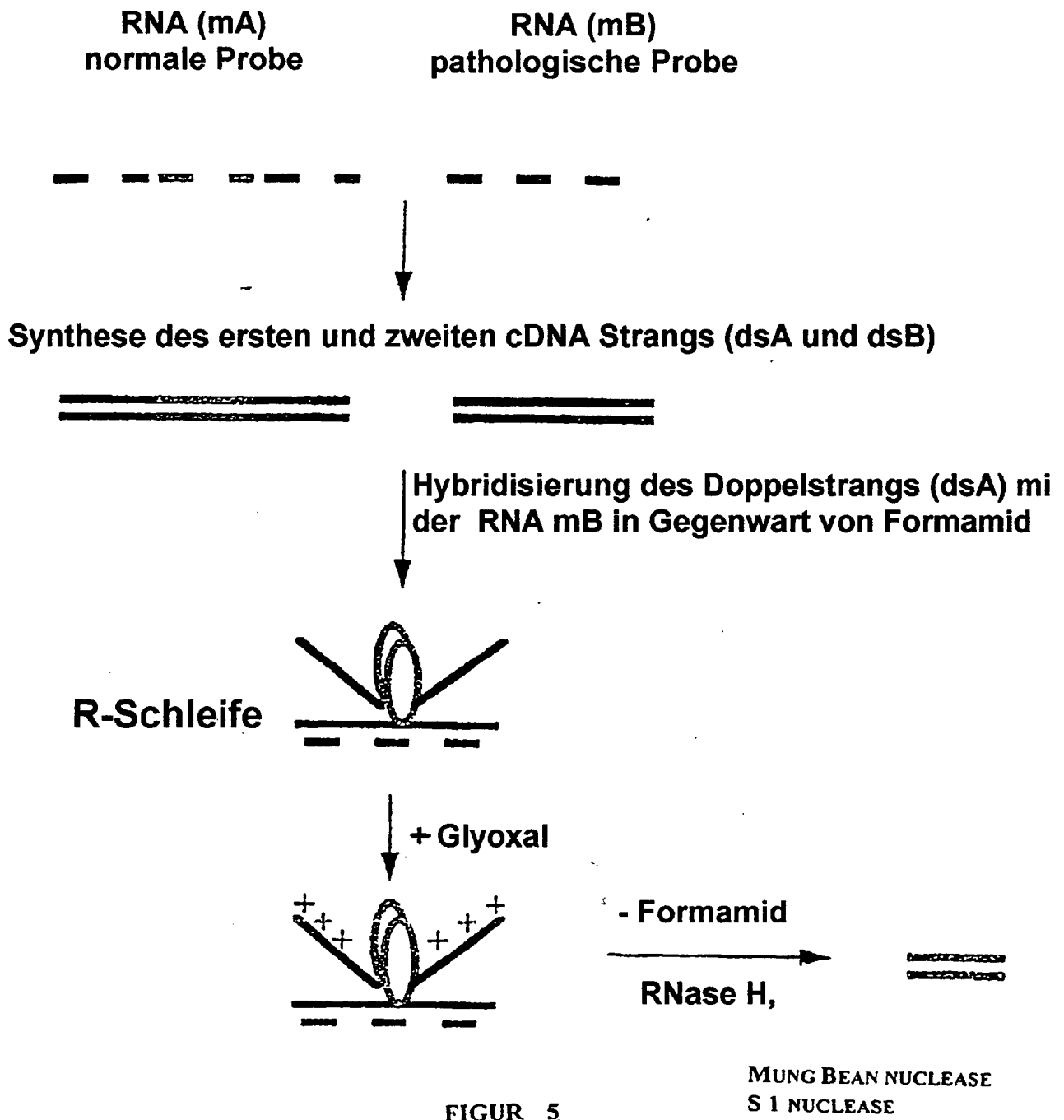


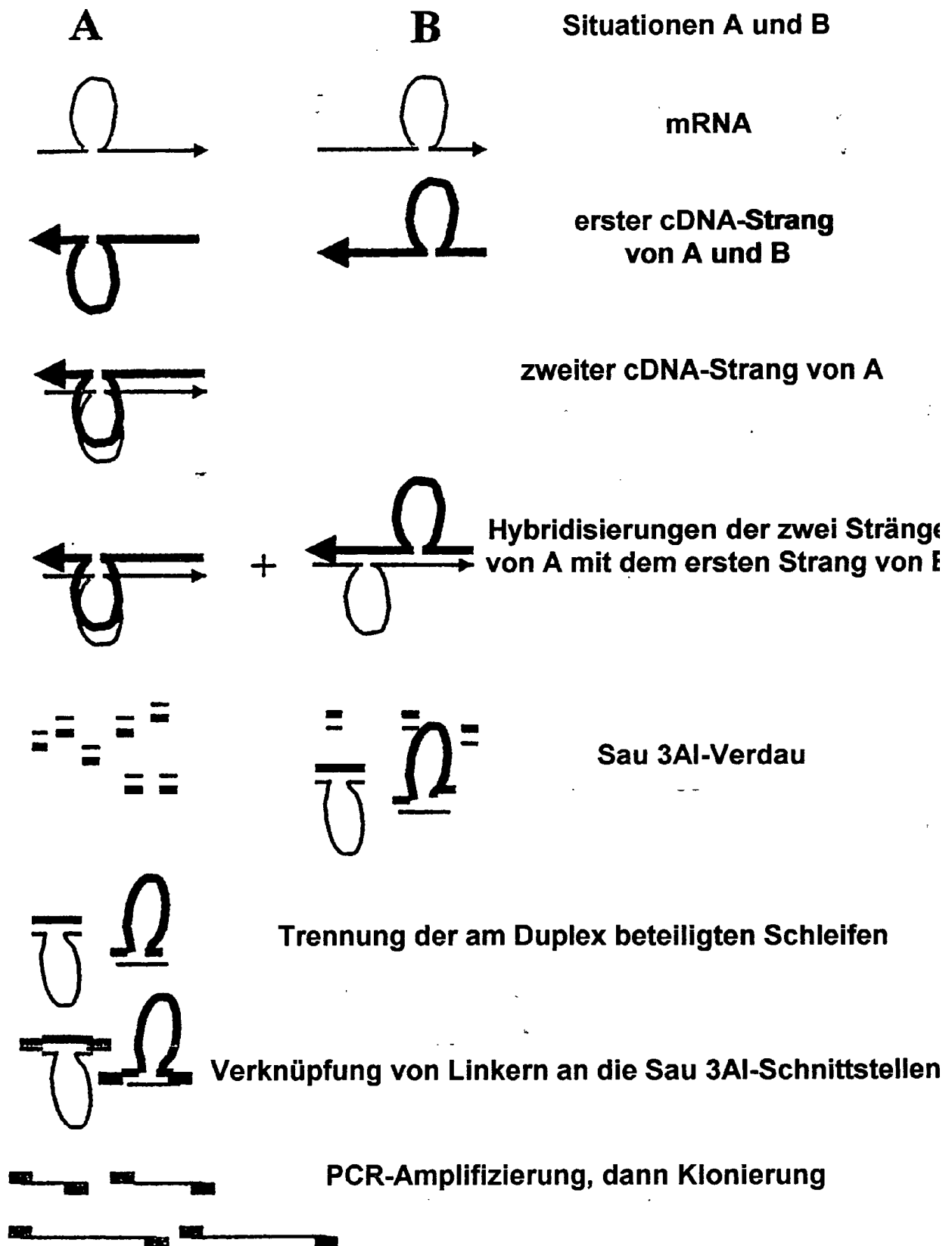
Klonierung und Sequenzierung

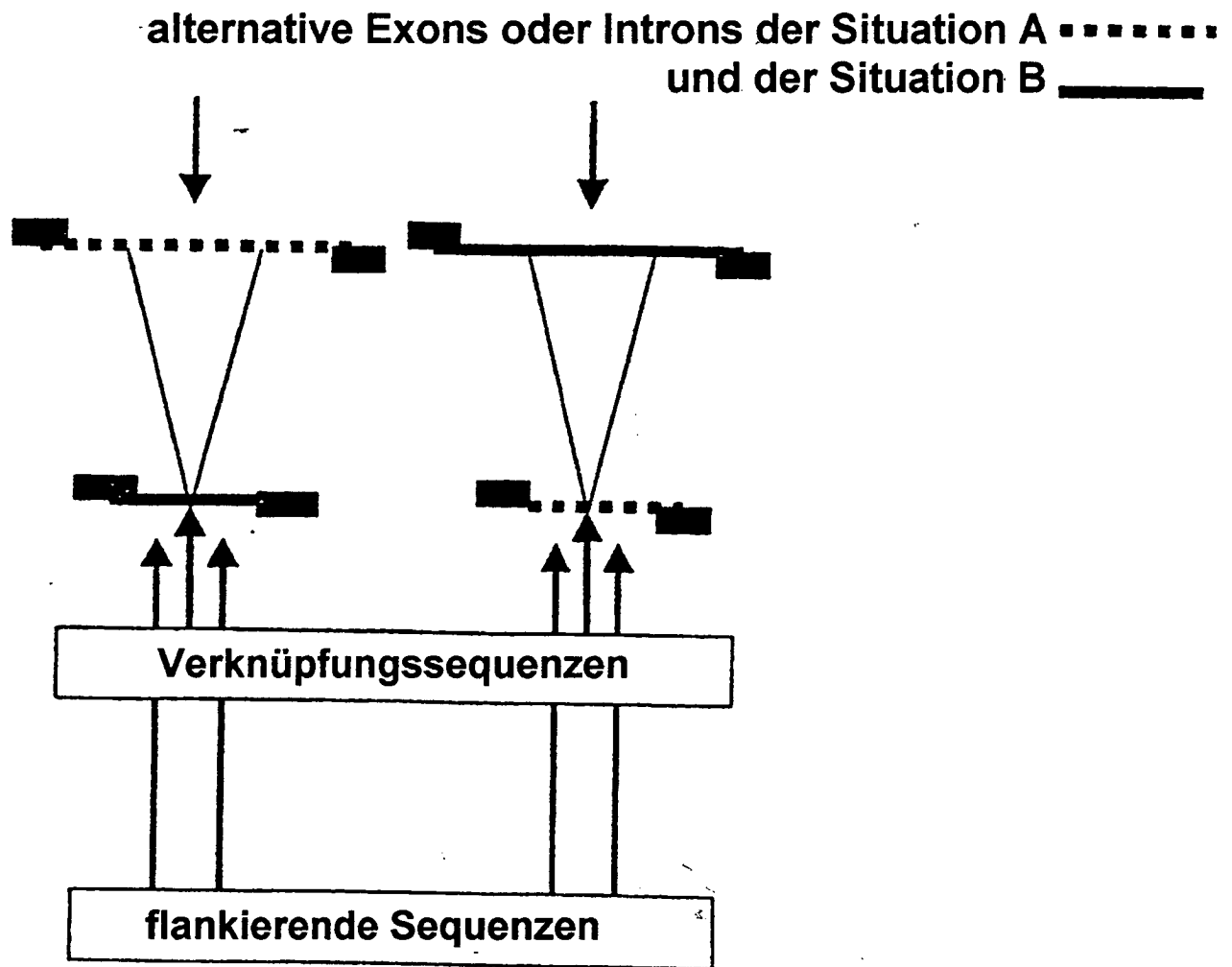
FIGUR 3



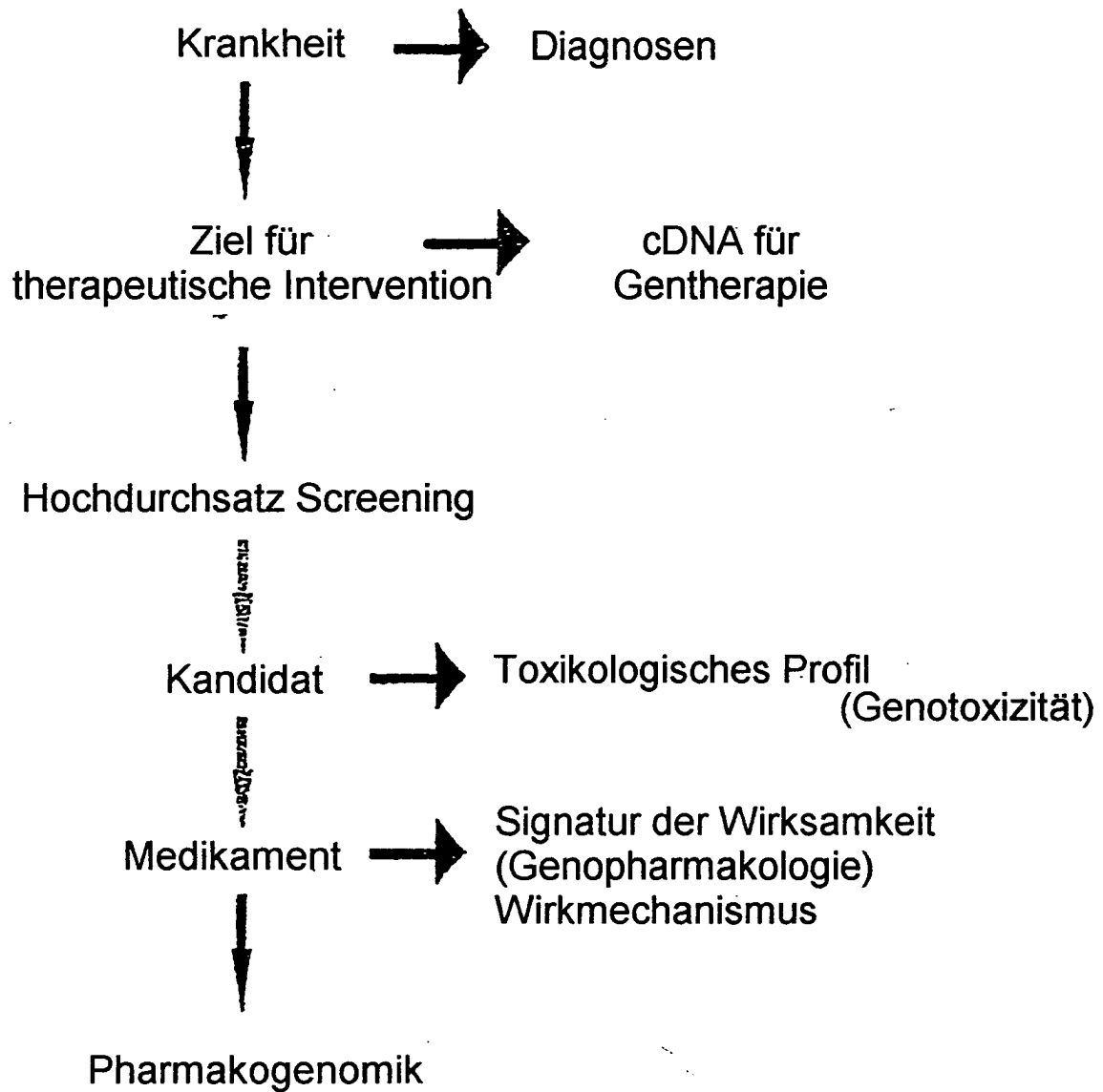
FIGUR 4





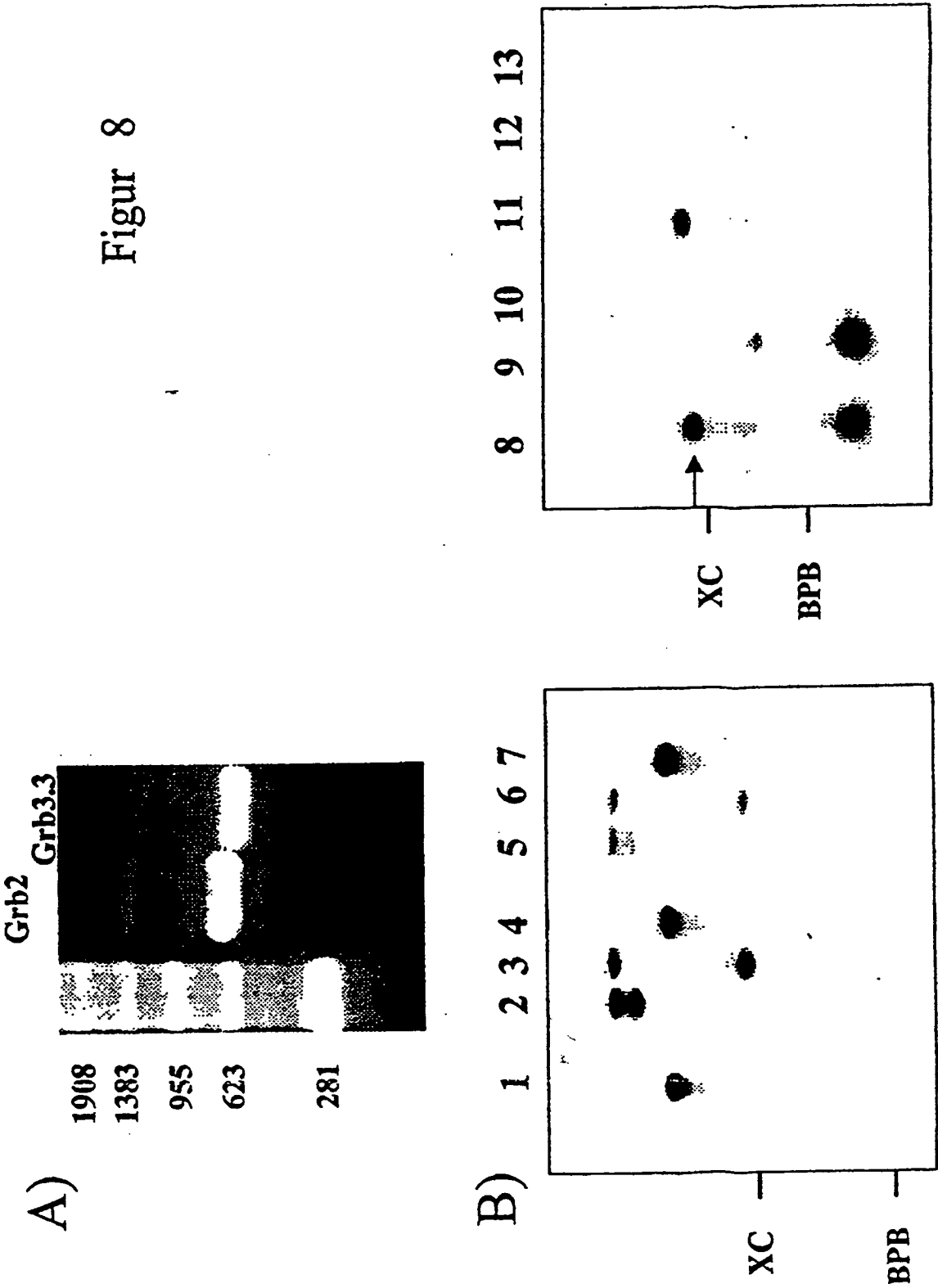


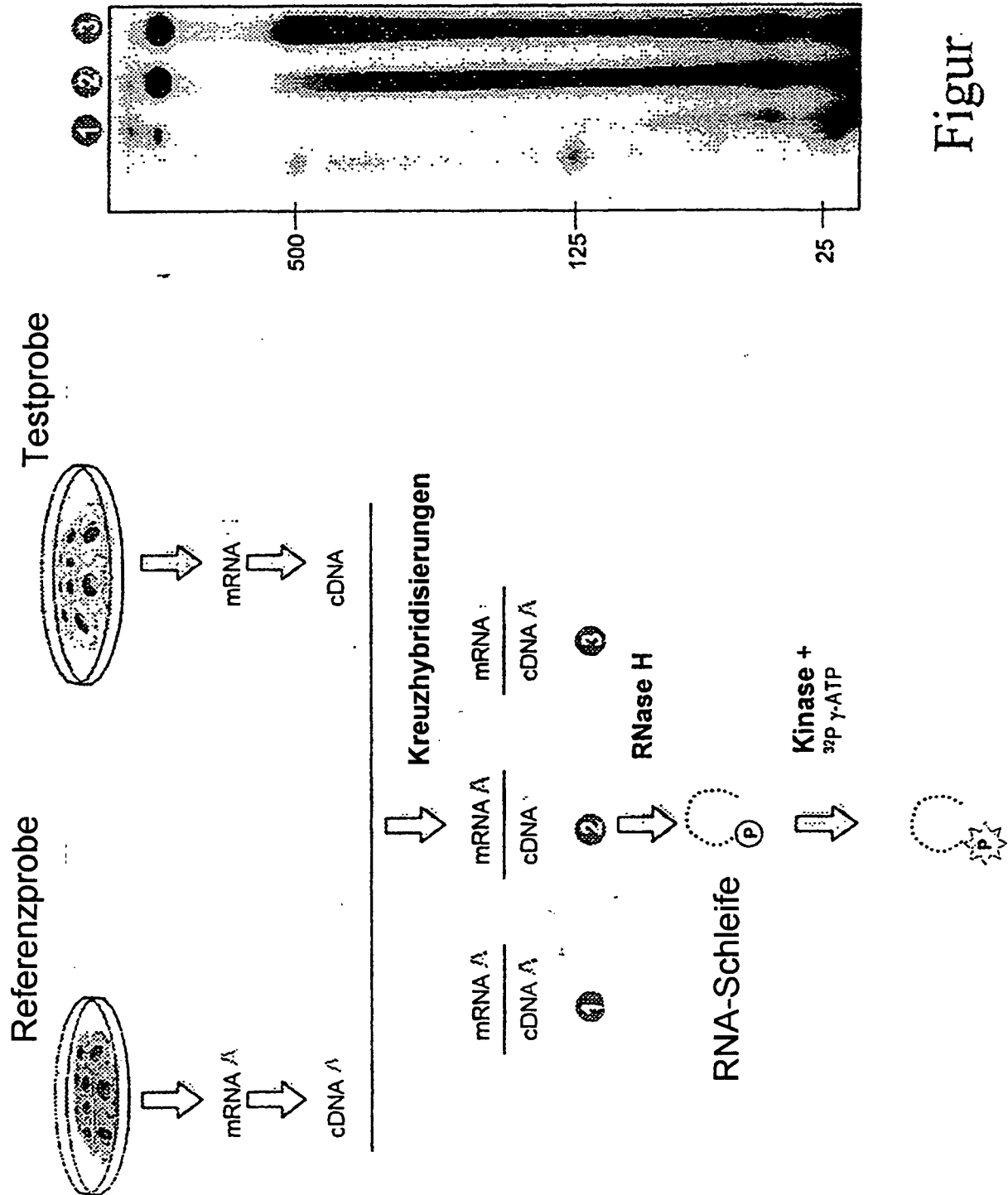
FIGUR 6B



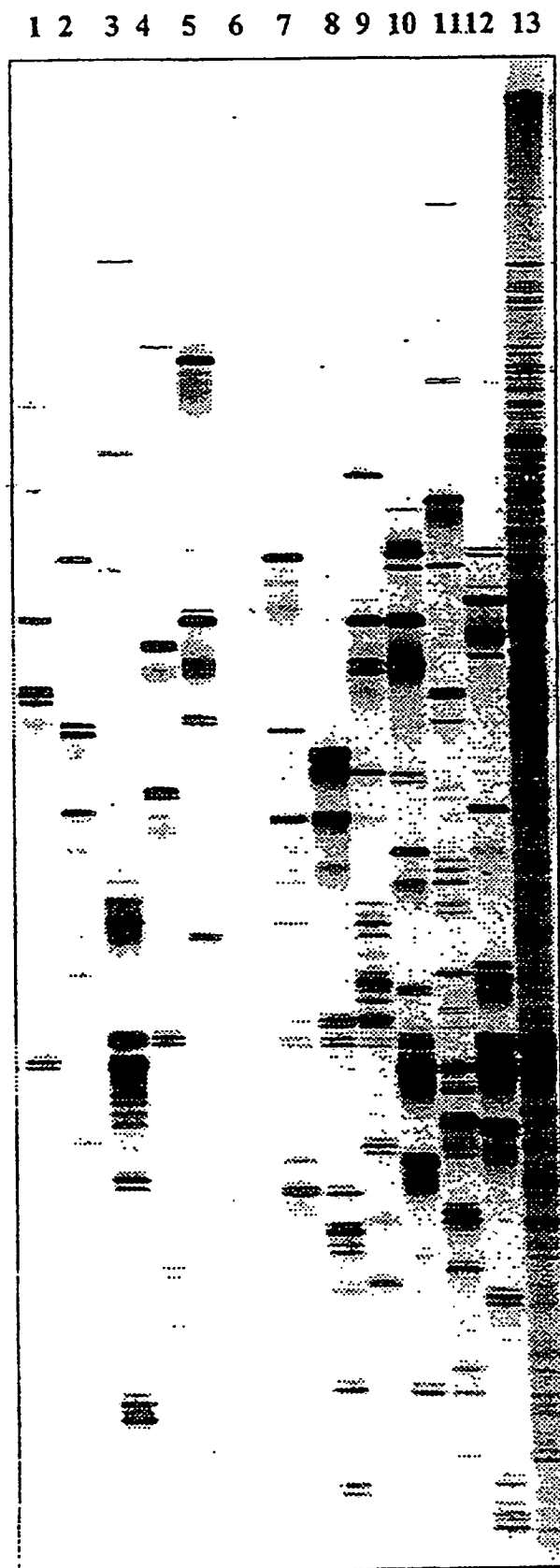
FIGUR 7

Figur 8



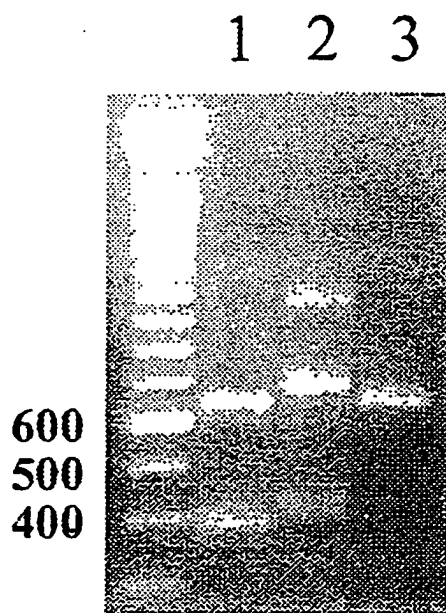


Figur 9

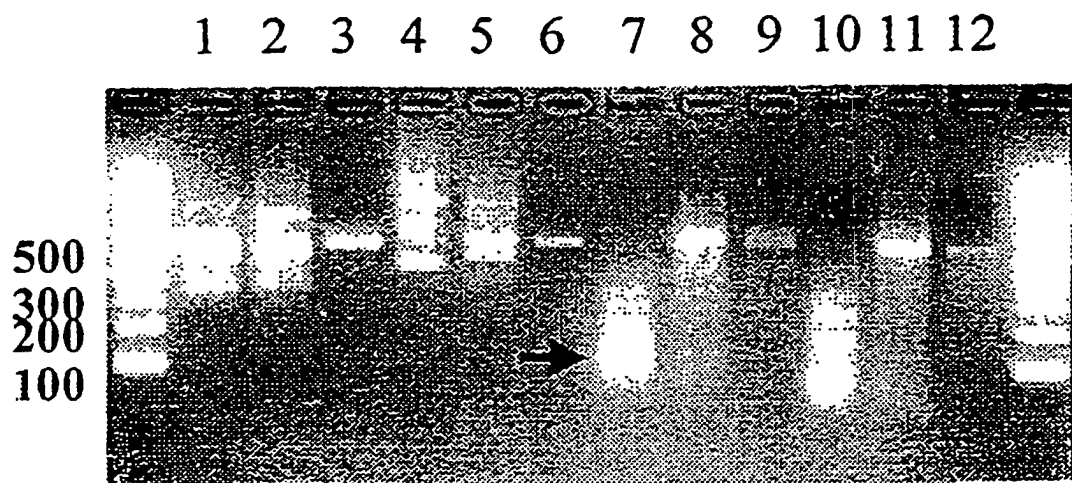


Figur 10

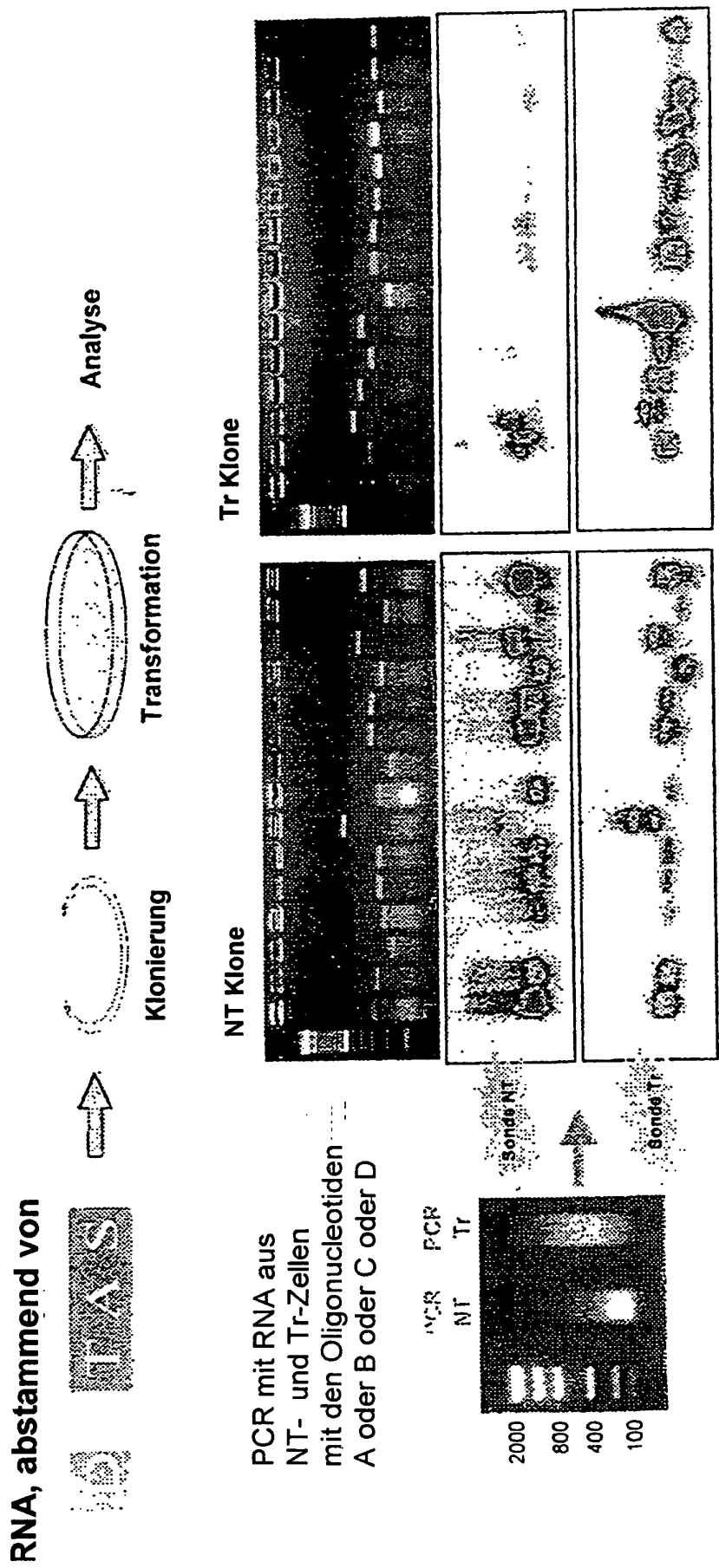
A)



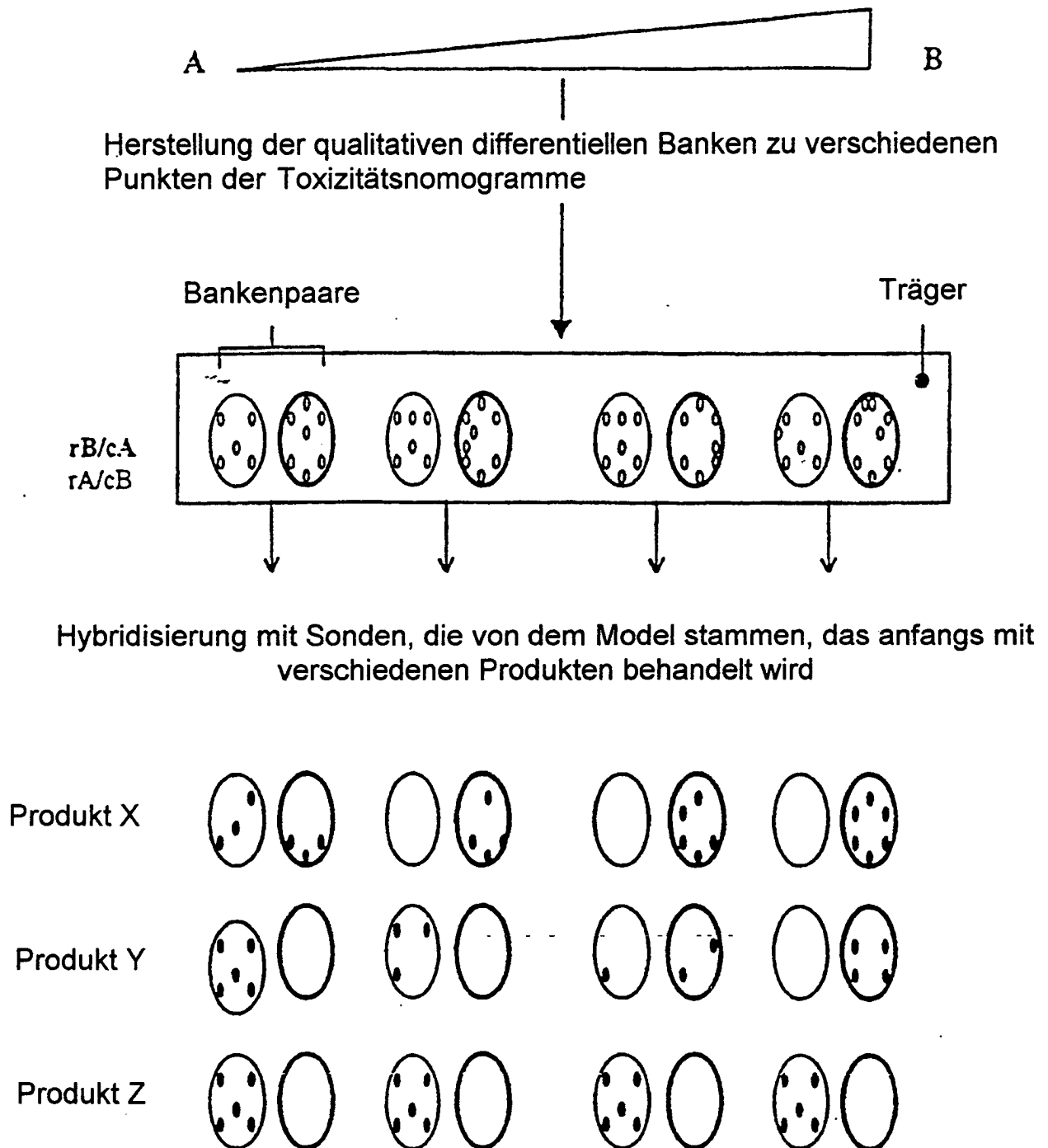
B)



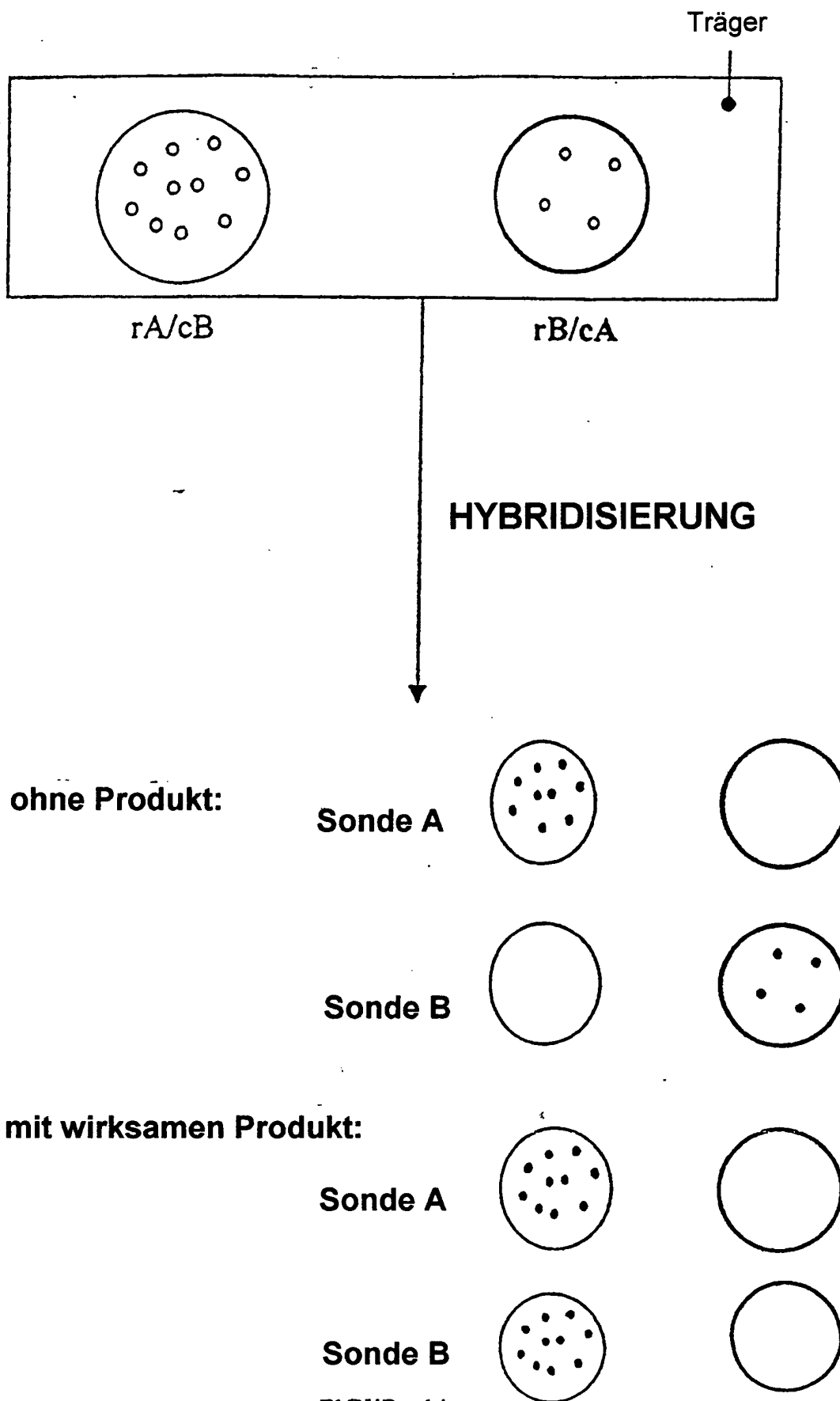
Figur 11



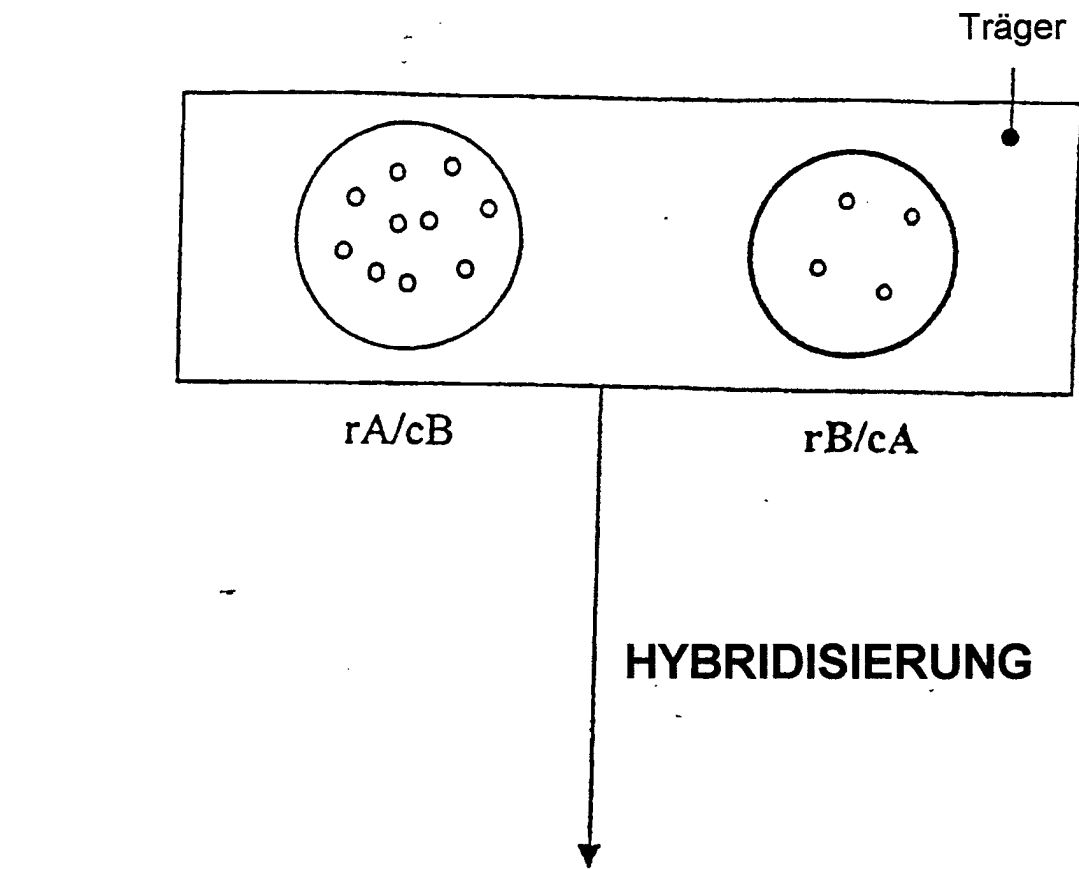
Figur 12



FIGUR 13



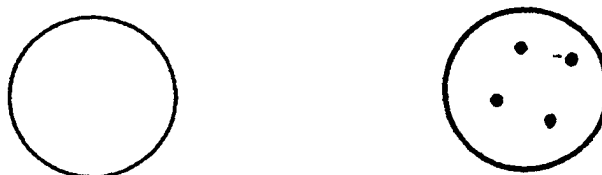
FIGUR 14



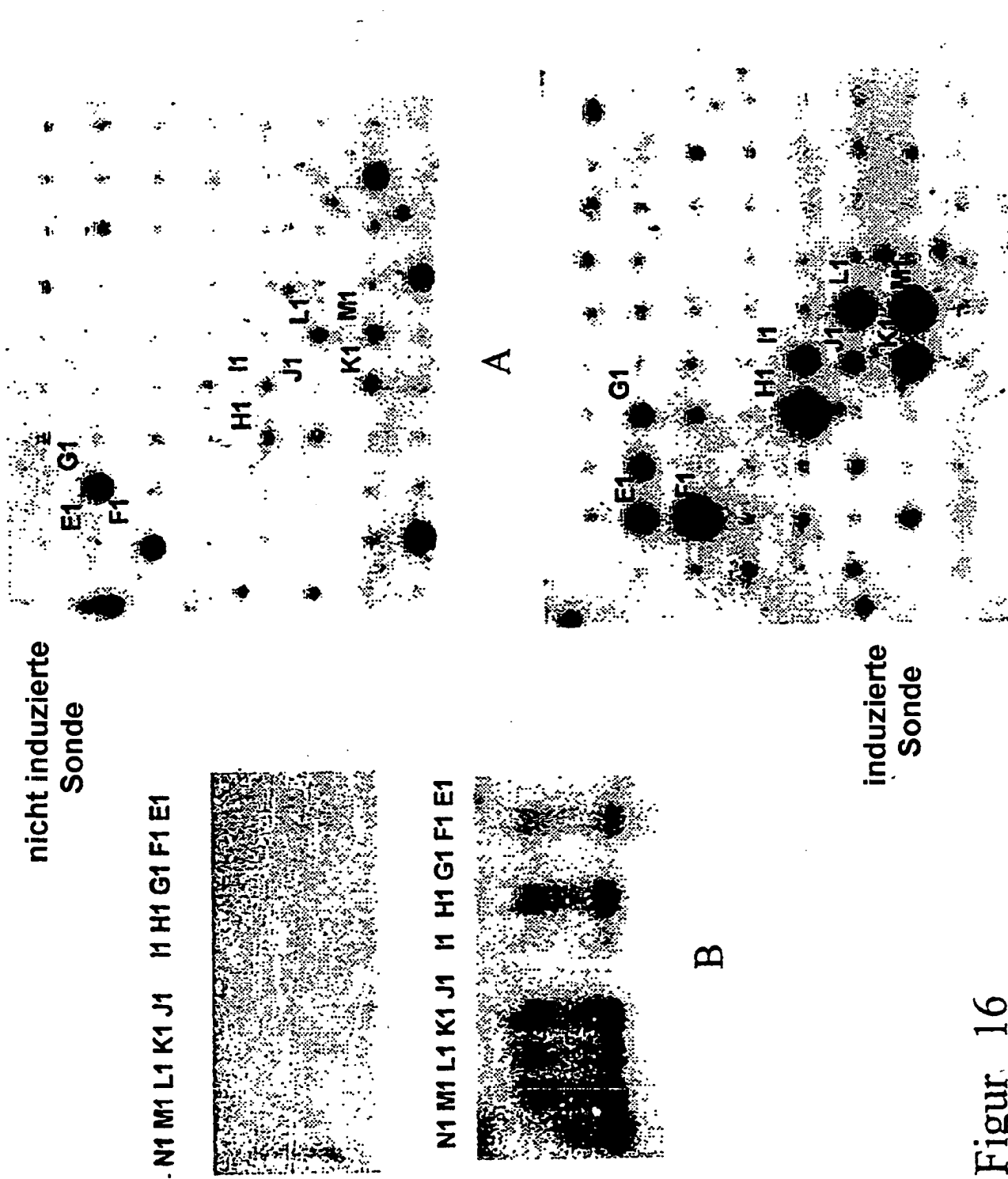
Biopsie von Reagierenden:



Biopsien von nicht Reagierenden:



FIGUR 15



Peptidsequenz von ΔSHC (SEQ ID NR.:9)

1

MNKLSGGGGR RTRVEGGQLG GEEWTRHGSF VNKPTRGWLH PNDKVMGPGV
 SYLVRYMGCV EVLQSMRALD FNTRTQVTRE AISLVCEAVP GAKGATRRRK
 PCSRPLSSIL GRSNLKFAGM PITLTVSTSS LNLMAADCKQ IIANHHMQSI
 SFASGGDPDT AEYVAYVAKD PVNQRACHIL ECPEGLAQDV ISTIGQAFEL
 RFKQYLRNPP KLVTPHDRMA GFDGSAWDEE EEEPPDHQYY NDFPGKEPPL
 GGVVDMRLRE GAAPGAARPT APNAQTPSHL GATLPVGQPV GGDPEVRKQM
 PPPPPCPGRE LFDDPSYVNV QNLDKARQAV GGAGPPNPAI NGSAPRDLFD
 MKPFEDALRV PPPQSVSMA EQLRGEPWFH GKLSRREA EA LLQLNGDFLV
 RTKDHREFESV SHLISYHMDN HLPISAGSE LCLQQPVERKL

441

Nucleotidsequenz von ΔSHC (SEQ ID NR.:10)

atgaacaagc	tgagtggagg	cggcgggagc	aggactcggg	tggaaggggg	50
ccagcttggg	ggcgaggagt	ggacccgcca	cgggagcttt	gtcaataagc	100
ccacgcgggg	ctggctgcat	cccaacgaca	aagtcattggg	acccgggggtt	150
tcctacttgg	ttcggtacat	gggttggttg	gaggtcctcc	agtcaatgag	200
tgccctggac	ttcaacaccc	ggactcagg	caccaggagg	gccatcagtc	250
tggtgtgtga	ggctgtgccg	ggtgctaagg	gggcgacaag	gaggagaaag	300
ccctgtagcc	gcccgtcag	ctctatcctg	gggaggagta	acctgaaatt	350
tgctggaatg	ccaatcactc	tcaccgtctc	caccagcagc	ctcaacctca	400
tgccgcgaga	ctgcaaacag	atcatcgcca	accaccacat	gcaatctatc	450
tcatttgcat	ccggcgggga	tccggacaca	gccgagtatg	tcgcctatgt	500
tgccaaagac	cctgtgaatc	agagagcctg	ccacattctg	gagtgtcccg	550
aagggcttgc	ccaggatgtc	atcagcacca	ttggccaggc	cttcgagttg	600
cgcttcaaac	aatacctcag	gaaccacccc	aaactgggtc	cccctcatga	650
caggatggct	ggctttgatg	gctcagcatg	ggatgaggag	gaggaagagc	700
cacctgacca	tcagtactat	aatgacttcc	cggggaagga	accccccttg	750
gggggggtgg	tagacatgag	gcttcgggaa	ggagccgctc	caggggctgc	800
tcgaccact	gcacccaatg	cccagacccc	cagccacttg	ggagctacat	850
tcgctgtagg	acagcctgtt	gggggagatc	cagaagtccg	caaacagatg	900

FIGUR 17A

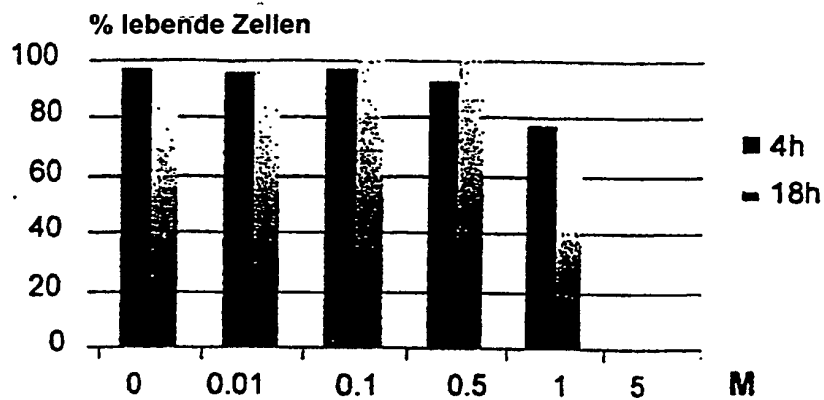
```

ccacctccac caccctgtcc aggcagagag ctttttgatg atccctccta 950
tgtcaacgtc cagaacctag acaaggcccg gcaagcagtg ggtggtgctg 1000
ggccccccaa tcttgctatc aatggcagtg caccocggga cctgtttgac 1050
atgaagccct tcgaagatgc tcttcgggtg cctccacctc cccagtcggt 1100
gtccatggct gagcagctcc gaggggagcc ctggttccat ggggaagctga 1150
gccggcggga ggctgaggca ctgctgcagc tcaatgggga cttcttggtt 1200
cggactaagg atcacgctt tgaaagtgtc agtcacctta tcagctacca 1250
catggacaat cacttgccca tcattctctgc gggcagcgaa ctgtgtctac 1300
agcaacctgt ggagcggaaa ctgtga 1326

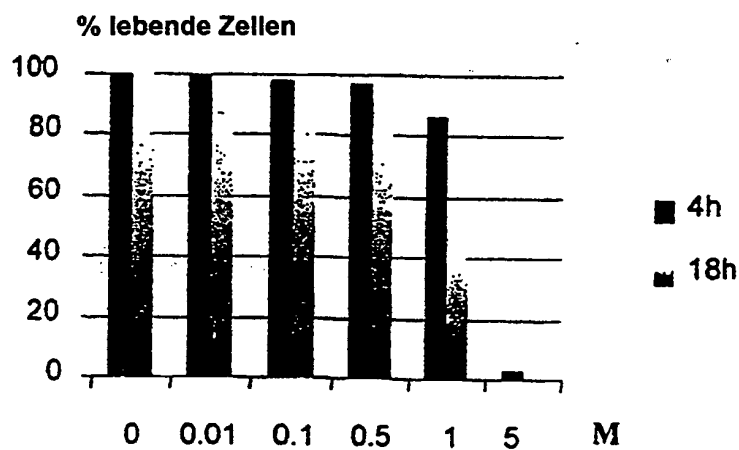
```

FIGUR 17B

Trypan-Blau HepG2 / Ethanol

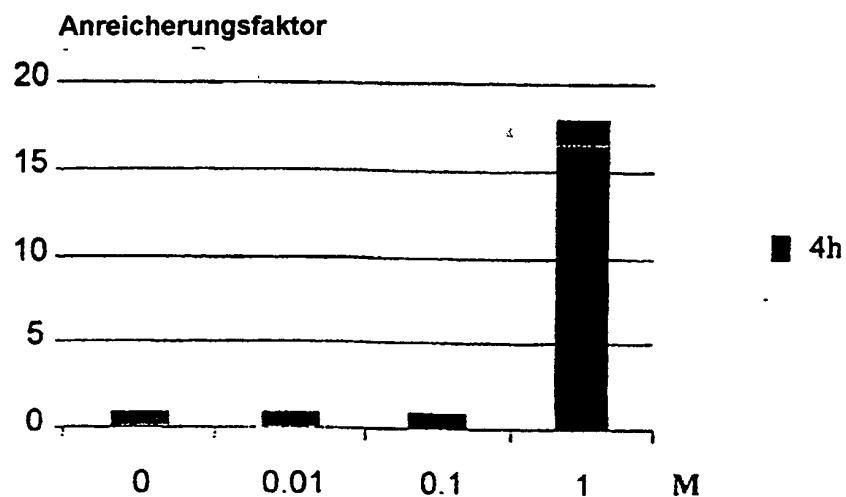


MTT-Test



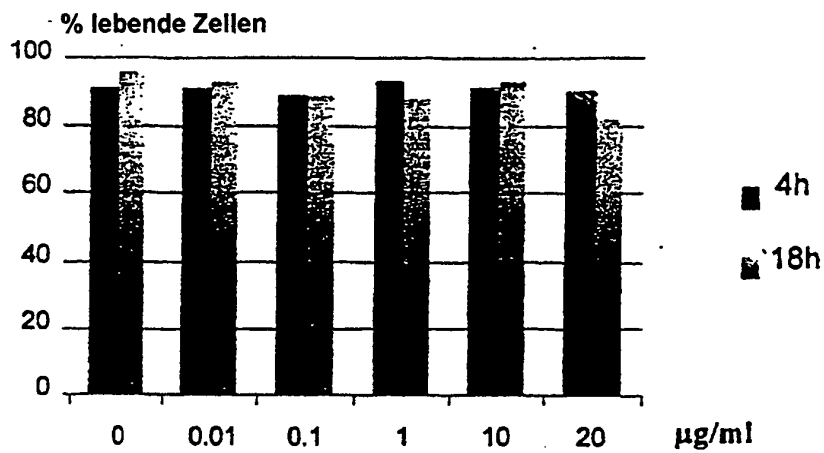
FIGUR 18A

ELISA-Test der Fragmentierung der DNA

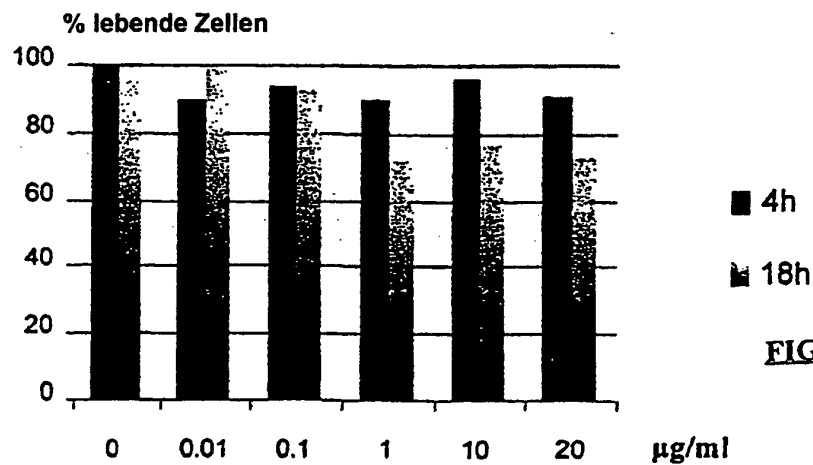


HepG2 / Camptothecin

Trypan-Blau

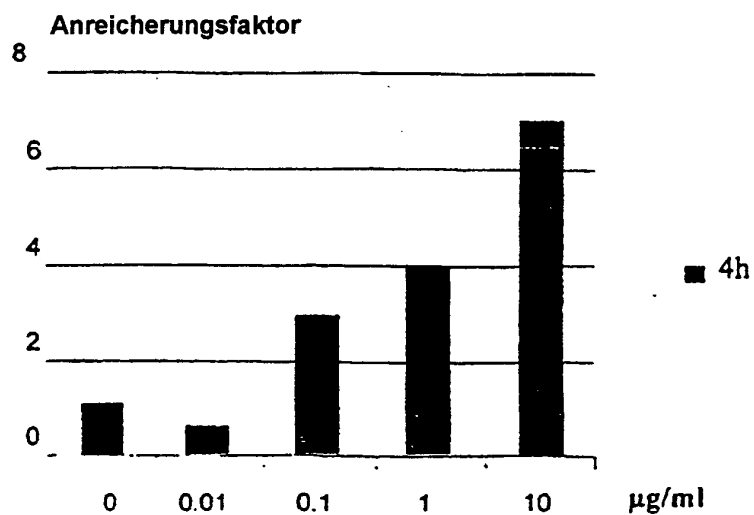


MTT-Test



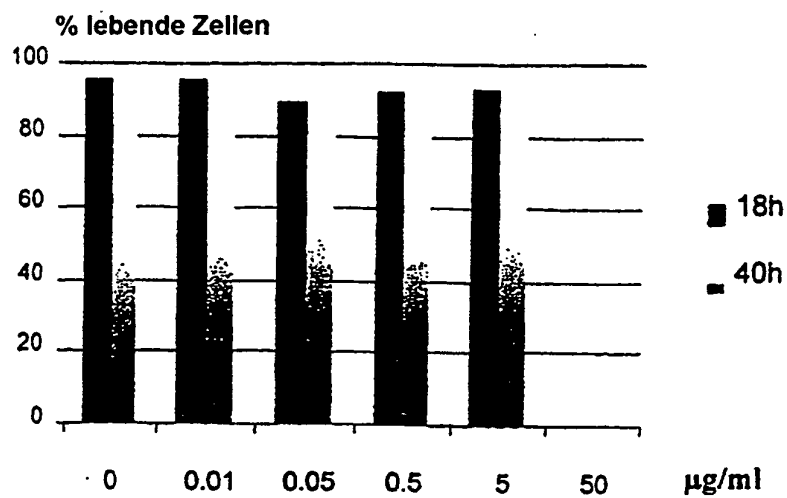
FIGUR 18B

ELISA-Test der Fragmentierung der DNA

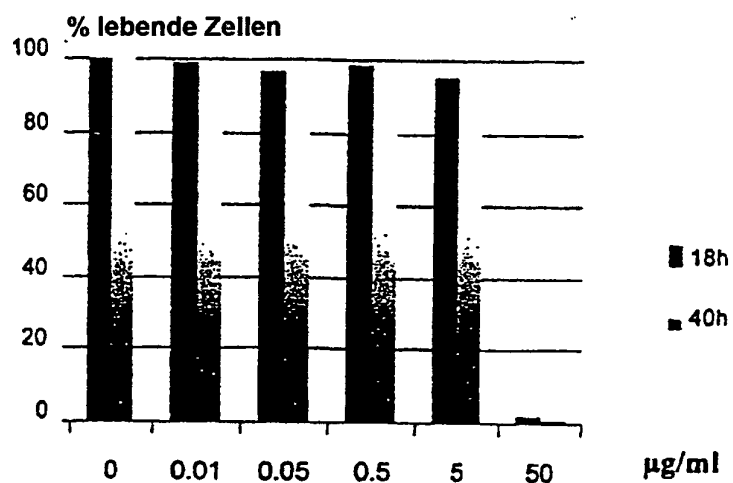


HepG2 / PMA

Trypan-Blau

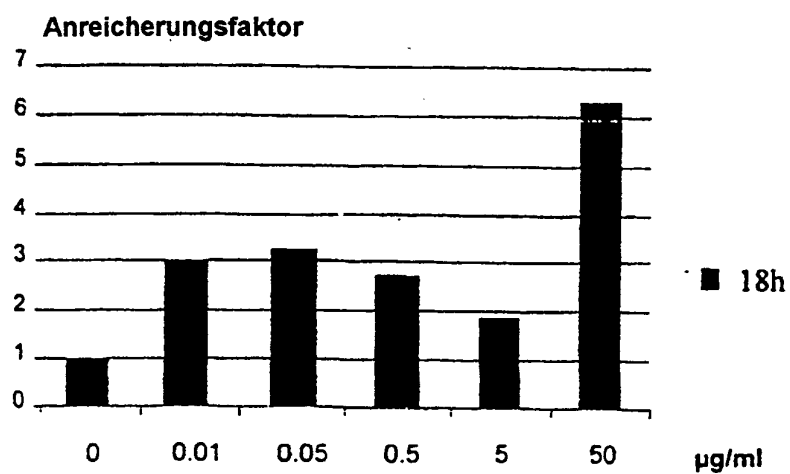


MTT-Test



ELISA-Test der Fragmentierung der DNA

FIGUR 18C



Figur 19

